



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 :**

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme LOUISE CHANTEPIE

le jeudi 19 décembre 2019

**Titre :**

Mise en évidence et analyse fonctionnelle des mutations affectant la  
proliféricité des ovins allaitants

---

**Ecole doctorale :**

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**

Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage ( GENPHYSE)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. STEPHANE FABRE

**Rapporteurs :**

M. CHRISTOPHER PRICE, UNIVERSITE DE MONTREAL

M. ERIC PAILHOX, INRA JOUY EN JOSAS

**Membre(s) du jury :**

Mme NADINE BINART, INSERM PARIS, Président

Mme SANDRINE FRERET, INRA TOURS, Membre

M. STEPHANE FABRE, INRA TOULOUSE, Membre



# Remerciements

J'adresse mes premiers remerciements pour le financement de cette thèse et pour m'avoir permis d'effectuer ce travail à APIS GENE ainsi qu'aux fonds européens de développement régional FEDER (Interreg POCTEFA 2014-2020 ; PIRINNOVI).

Je tiens à remercier les membres du jury pour avoir consacré de leur temps à l'évaluation de ce manuscrit. Eric Pailhoux et Christopher Price, merci d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que Nadine Binard et Sandrine Freret pour avoir accepté d'en être les examinatrices.

Merci également aux membres de mon comité de thèse pour leur expertise : Jorge Calvo, Carine Capel, Rozenn Dalbies-Tran et Flavie Torteraux.

Sans la collaboration et l'aide des Organismes de Sélection ovins allaitants ce travail n'aurait jamais pu être réalisé, merci à eux, et tout particulièrement à Ovi-Test. Je remercie également tous les éleveurs qui nous ont accueillis sur leurs exploitations et nous ont fait confiance.

Trois années de thèse, c'est du temps consacré à la recherche, mais aussi du temps pour rencontrer des personnes qui chacune à leur échelle m'ont beaucoup apporté que ce soit professionnellement parlant ou personnellement, merci à vous tous !

À mon « Supervisor », Stéphane, qui a su gérer mon caractère (pas toujours des plus simple) et mon impatience. Mais quelle idée tu as eu de prendre une thésarde qui écrit comme ses pieds ? Parce qu'une thèse ce n'est pas que de la science, tu m'as appris la remise en question, la confiance en soi et la débrouillardise. Toujours avoir un couteau suisse dans la poche, c'est ça le secret ! Camille, avant moi, voulait déjà arriver à te contredire, j'ai tout tenté également, je laisse le défi à Maxime désormais.

À Loys et ses données de prolificité sur toutes les brebis qu'il peut trouver ! Sans toi et tes modèles « simples » je n'aurais jamais eu autant de résultats. Pas toujours simple de communiquer ensemble mais nous y sommes arrivés. C'est avec toi, Laurence et Julien R que j'ai découvert les joies des prélèvements en élevage, à peine une semaine après mon arrivée à l'INRA en stage, et malgré tout j'ai continué et j'y suis même retournée pour mon plus grand plaisir !

Un agradecimiento especial a Belén y Jorge por haberme acogido durante tres meses en Zaragoza. À Kenza pour ta gentillesse et tes petits plats traditionnels qui m'ont permis de manger autre chose que des Patatas.



Un grand merci à l'équipe GenROC pour sa bonne humeur et son côté « ronchonchon ». Gwenola, une cheffe d'équipe hors-pair et d'une patiente inégalable. À Laurence, la reine du rangement, des boîtes et de l'organisation. D'un soutien sans faille et toujours disponible pour un petit protocole et 2-3 prélèvements. Carine m'a colocataire de bureau pas toujours très discrète mais qui nous fait tous rire avec ses boulettes. À Florence, Julien et Florent, pour m'avoir appris tellement de choses à la paillasse, mais pas que... Vous avez été courageux de me supporter pendant plus de 3 ans ! Julien, je note une perte d'efficacité sur les derniers génotypes. Et oui, tu nous as mal habitués avec ton 100% de réussite ! Florence, on ne fera plus de Western ou de retard sur gel, je crois que c'est une bonne chose si on ne veut pas mettre le feu au labo. Par contre, je suis toujours présente pour un atelier Mojito.

Un énorme merci à l'équipe de Langlade et Fanny pour avoir pris soin de mes chères brebis. Toujours présents pour les prélèvements, pour me dépanner avec Sidex et tout ça dans la bonne humeur.

Merci à toutes les personnes du labo qui m'ont accompagné pendant toute cette période, Katia, Sophie, Pitou, Laure, Lisa, Nathalie, Julien R et je suis certaine d'en oublier ...

Aux thésards de GenPhySE, profitez à fond de ces années de thèse et courage pour la rédaction, ce n'est pas facile mais ça en vaut la peine !

J'ai aussi eu la chance aussi de lier des liens d'amitié très forts, alors à toi, Kiki qui avec Zazou êtes toujours là, merci ! Une copine de thèse comme toi ne s'invente pas « si-là » elle n'aurait pas été aussi extraordinaire que toi.

Il y a eu également Nono, toujours pétillante et joyeuse ! Merci pour ta bonne humeur et ton soutien sans faille. Sans toi je serais encore entrain de faire mes déductions de génotypes à la main ^^

L'équipe des badistes alias « Les rageux » parfois, il nous arrive de faire du badminton mais surtout on passe de bons moments de rigolades ensemble ! Sans vous mes soirées et week-end seraient terriblement ennuyants et je n'aurais jamais connu le 103. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté et en particulier à Alice qui a relu l'entièreté de cette thèse sans rien y connaître au sujet, quel courage !

À Q-ry qui me supporte depuis 2011 et l'école d'ingé, on en a fait des choses ensemble et ce n'est pas près de s'arrêter !

Merci à mes parents pour leur soutien et leur amour, promis, les études c'est fini pour moi ! À ma sœur Alice, avec qui je n'ai jamais été aussi proche malgré les plus de 900km qui nous sépare. Évidemment, une pensée pour tous les membres de ma famille, grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines, je suis fière de vous tous et de faire partie de cette famille.





# Sommaire

PREAMBULE.....	1
INTRODUCTION.....	3
<b>I. Stratégies de découverte des gènes majeurs « Fec » influençant le nombre d'ovulations et la prolificité</b>	<b>4</b>
A. Approches familiales .....	4
1) Gène <i>FecB</i> – mutation Booroola .....	4
2) Gène <i>FecX</i> – mutation Inverdale ( <i>FecX<sup>I</sup></i> ) et Hanna ( <i>FecX<sup>H</sup></i> ).....	7
3) Gène <i>FecG</i> –mutation Icelandic/Thoka ( <i>FecI<sup>T</sup></i> ou <i>FecG<sup>T</sup></i> ).....	8
4) Gène <i>FecL</i> – mutation Lacaune <i>FecL<sup>L</sup></i> .....	17
B. Approche mutations et/ou gènes candidats.....	10
1) BMPR1B – FecB.....	11
2) BMP15 – FecX .....	12
3) GDF9 – FecG.....	15
4) B4GALNT2 – FecL .....	17
C. Les autres gènes candidats associés à la prolificité ovine.....	18
1) Gène <i>LEPR</i> – Davisdale .....	18
2) Gène <i>FecW</i> – population Whishart .....	18
3) Gène <i>FecX2<sup>W</sup></i> – mutation Woodlands.....	18
4) Les gènes de la famille BMPs .....	20
5) Les gènes codant des récepteurs hormonaux.....	20
6) Le gène <i>HIRA</i> .....	21
D. Déterminisme génétique de la prolificité dans d'autres espèces .....	21
1) Les espèces monotoques caprines et bovines .....	22
2) L'espèce humaine.....	23
3) Les espèces polytoques murines et porcines.....	24
<b>II. Conséquences des mutations des gènes majeurs « Fec » sur la physiologie ovarienne .....</b>	<b>26</b>
A. Le système de signalisation cellulaire des BMPs.....	26
1) Les ligands et récepteurs .....	28
2) Les facteurs SMADs, effecteurs intracellulaires .....	28
3) Régulation de la voie de signalisation .....	28
B. Folliculogenèse et physiologie ovarienne chez la brebis .....	29
1) La folliculogenèse et la cyclicité .....	30
2) L'atrésie folliculaire .....	65
3) La puberté.....	34
4) Saisonnalité de la cyclicité .....	35
C. Conséquences des mutations du système BMP associées à l'hyperprolificité sur la fonction ovarienne	35



1) FecB / BMPR1B.....	36
2) FecX / BMP15.....	38
3) FecG / GDF9 .....	40
4) Modèles de contrôle du nombre d'ovulations par les BMPs chez la brebis .....	41
D. Conséquences de la mutation <i>FecL/B4GALNT2</i> associée à l'hyperprolificité sur la fonction ovarienne	45
<b>SITUATION DU SUJET ET OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>47</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>51</b>
<b>PARTIE 1 – MISE EN EVIDENCE DE MUTATIONS A EFFET MAJEUR SUR LA PROLIFICITE.....</b>	<b>52</b>
<b>I. Approche mutations et gènes candidats .....</b>	<b>53</b>
A. Populations Noire du Velay et Mouton Vendéen.....	53
1) Principaux résultats.....	53
2) Article I - Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du Velay and Mouton Vendéen sheep breeds, Livestock Science .....	55
B. Population Ile-de-France .....	60
C. Population Causse du Lot .....	63
D. Population Mouton Flemish - Belgique .....	65
E. Population Martinik Black Belly .....	66
1) Mise en évidence de la mutation .....	66
2) Fréquence et effet de <i>FecG<sup>F</sup></i> .....	67
<b>II. Approche globale sans <i>a priori</i>.....</b>	<b>68</b>
A. Populations Noire du Velay et Blanche du Massif Central.....	68
1) Analyse génétique génome complet .....	68
2) Caractérisation de la mutation <i>FecX<sup>N</sup></i> .....	70
3) Fréquence et effet de <i>FecX<sup>N</sup></i> sur la prolificité.....	73
4) Caractérisation fonctionnelle du rôle de <i>FecX<sup>N</sup></i> sur le gène <i>BMP15</i> .....	74
5) Article II – Genome-wide identification of a regulatory mutation in <i>BMP15</i> controlling prolificacy in sheep, soumis	75
B. Population Belle-île .....	85
C. Population Lacaune.....	85
D. Population Rasa Aragonesa .....	86
1) Analyse génétique d'association génome complet .....	87
2) Fréquence et effet de <i>FecX<sup>Gr</sup></i> sur la prolificité.....	87
3) Poster ISAG 2019.....	87
4) Article III – A new allele in the <i>BMP15</i> gene ( <i>FecX<sup>RA</sup></i> ) that affects prolificacy co-segregate with <i>FecX<sup>R</sup></i> and <i>FecX<sup>Gr</sup></i> in Rasa Aragonsa sheep.....	100
<b>III. Discussion – Partie 1 .....</b>	<b>101</b>

A.	Origine des mutations de prolificité partagées dans plusieurs populations .....	101
B.	Robustesse de l'effet prolifique des mutations dans différentes populations .....	103
C.	Impact fonctionnel des nouvelles mutations découvertes dans <i>BMP15</i> .....	104
1)	<i>FecX<sup>C</sup></i> – Mutation Cause du Lot.....	104
2)	<i>FecX<sup>f</sup></i> – Mutation Ile de France .....	107
3)	<i>FecX<sup>N</sup></i> – Mutation Noire du Velay .....	108

## PARTIE 2 – CARACTERISATION DES CONSEQUENCES PHYSIOLOGIQUES DE LA MUTATION *FECL<sup>L</sup>* ... 111

<b>I.</b>	<b>Effet de <i>FecL<sup>L</sup></i> de la naissance à la première mise-bas.....</b>	<b>112</b>
A.	Poids de naissance .....	114
B.	Croissance et Gain Moyen Quotidien (GMQ).....	114
C.	Mise en place de la puberté.....	116
D.	Première mise à la reproduction, œstrus, fertilité et prolificité naturelle.....	118
<b>II.</b>	<b>Effet de <i>FecL<sup>L</sup></i> sur la sensibilité à la PMSG.....</b>	<b>119</b>
A.	En élevage expérimental INRA .....	119
1)	Profils hormonaux de réponse à la PMSG .....	119
2)	Dénombrement des ovulations.....	123
3)	Fertilité à l'insémination animale.....	123
B.	En élevage commercial .....	124
<b>III.</b>	<b>Discussion – Partie 2 .....</b>	<b>125</b>
A.	Effet de <i>FecL<sup>L</sup></i> sur les caractéristiques zootechniques des brebis Lacaune .....	126
B.	Effet de <i>FecL<sup>L</sup></i> sur les profils endocriniens.....	130

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION .....	135
---	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	139
-----------------------------------	-----

LISTE DES PUBLICATIONS.....	149
-----------------------------	-----

LISTE DES ABREVIATIONS.....	150
-----------------------------	-----

LISTE DES FIGURES .....	151
-------------------------	-----

LISTE DES TABLEAUX .....	154
--------------------------	-----

LISTE DES PROCEDURES EXPERIMENTALES.....	155
--	-----

ANNEXE 1: INVOLVEMENT OF THE <i>FECX<sup>GR</sup></i> MUTATION IN THE HIGH PROLIFICACY OF THE FLEMISH SHEEP BREED IN BELGIUM .....	172
--	-----

Résumé .....	
--------------	--

Abstract.....	
---------------	--





(INTERBEV 2018)

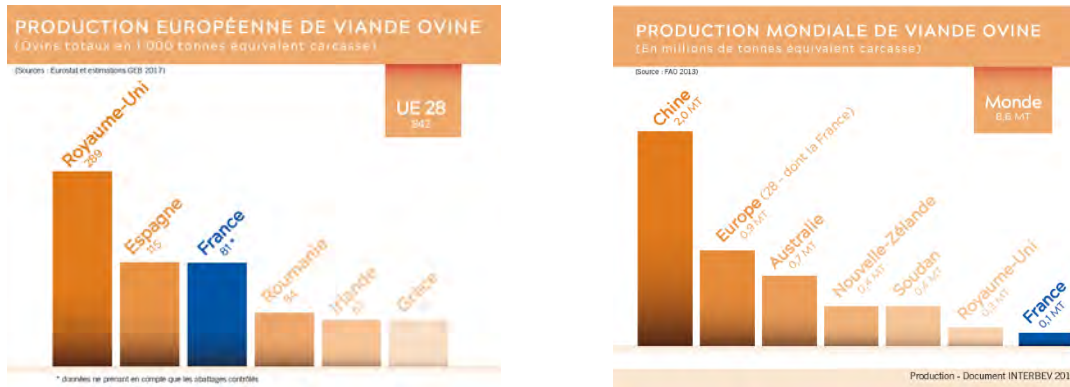


Figure 1: Place de la France au niveau Européen et Mondial sur la production de viande ovine.

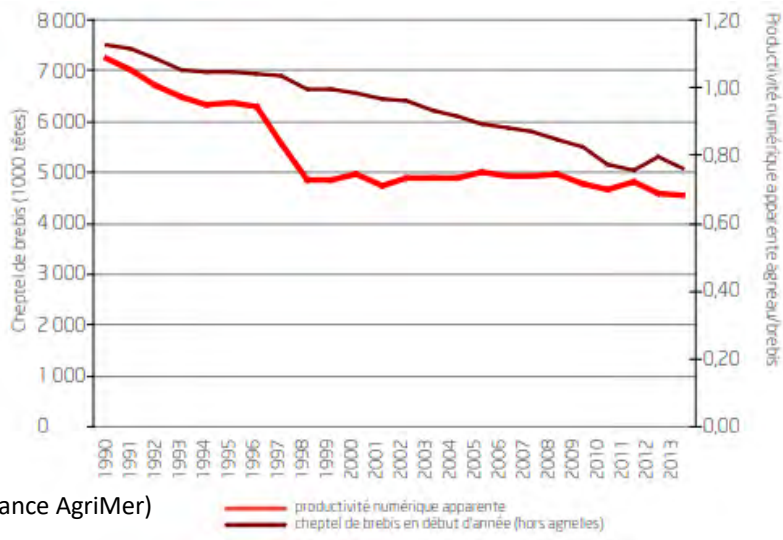


Figure 2: Évolution du cheptel de brebis et de la productivité numérique en France entre 1990 et 2013.

Tableau 1: Pondérations économiques et écarts-types génétiques des caractères d'intérêt en élevage ovine.

Caractères	Pondération €/unité	$\sigma_G$	Pondération standardisée
Fertilité (%)	0,76	10	20,7%
Proliférite (%)	0,48	16	21,2%
Survie (%)	1,17	8	25,7%
PAT30j (kg)	0,94	0,9	2,3%
GMQ30-70 (g/j)	0,005	20	0,3%
GMQengrais (g/j)	0,020	25	1,4%
Gras (mm)	9,41	0,63	16,2%
Conformation (classe)	7,31	0,23	4,6%
Rendement (%)	2,43	1	6,6%
Désaisonnement (%)	0,03	10	0,9%

(Guerrier et al. 2010)



# Préambule

La production de viande ovine représente 8,6 millions de tonnes en équivalent carcasse dans le monde. La production française avec 100 000 tonnes se situe derrière le Royaume-Uni et l'Espagne au niveau Européen (Figure 1). La Chine, avec 2 millions de tonnes, est le plus gros producteur mondial de viande ovine devant l'Europe avec 900 000 tonnes en 2018. La consommation de viande ovine en France a chuté de 29% entre 1990 et 2013 passant de 5,4 kg/habitant/an à seulement 2,7 kg/habitant/an ce qui ne représente plus que 4% de la viande consommée toutes espèces confondues. C'est donc un marché qui se dégrade.

La baisse de productivité des élevages ovins producteurs de viande est estimée à 1% par an depuis 2000, malgré les efforts de la sélection génétique qui portent à la fois sur les aptitudes bouchères et sur les qualités maternelles. Les aptitudes maternelles comprennent des caractères tels que la facilité d'agnelage, la capacité à nourrir les petits, la fertilité et la prolificité. C'est la productivité numérique, directement en lien avec la prolificité, qui semble être un des indicateurs de productivité le plus altéré (Figure 2). En 20 ans, elle n'a cessé de reculer avec une période de forte baisse de 1990 à 1999 (-30%). Il est donc important de travailler sur la maîtrise de ce caractère qui est sélectionné depuis plusieurs décennies dans les races ovines allaitantes. La rentabilité est basée sur trois composantes (Benoit and Laignel, 2009): le taux de mises bas (nombre annuel de mises bas par femelle), le taux de mortalité (nombre de petits morts, avortements tardifs identifiés, nombre de petits nés) et la prolificité. La prolificité correspond au nombre de petits nés, vivants ou morts (avortons compris), sur le nombre de mises bas (avortements compris) et dépend directement du nombre d'ovulations. Un gain de prolificité combiné à une amélioration de la survie et la croissance des agneaux représente un levier très positif de l'efficacité technico-économique d'un élevage comme on peut le voir dans le Tableau 1 (Guerrier et al., 2010; Notter, 2008). Par exemple en race ovine allaitante Blanche du Massif Central, à partir de modélisations des systèmes d'élevages majoritaires, l'effet d'une augmentation d'un point de prolificité a été évalué à une marge brute supplémentaire de 0,41 € par brebis (Dieny, 2011; Guerrier et al., 2010)





La prolificité est un caractère polygénique faiblement héritable, ne permettant que des gains génétiques faibles et lents en sélection (héritabilité  $h^2 = 0,05 - 0,2$  ; Bradford, 1985). Le caractère est géré par de nombreux gènes à petits effets, il montre une variabilité génétique importante ( $\sigma_G = 16$  ; Tableau 1). En effet, au sein de certaines races, il peut exister une grande disparité entre les femelles, certaines sont très prolifiques (jusqu'à 7 agneaux par mise-bas) et d'autres peu prolifiques (1 agneau par mise bas). C'est cette caractéristique qui a permis dans certaines races ovines des gains génétiques importants et rapides dus à la présence de mutations à fort effet dans des gènes uniques : les gènes majeurs de prolificité « *Fec* » (ou « Fecundity gene » en terminologie anglo-saxonne (pour revue Fabre et al., 2006).

De nombreux gènes de prolificité « *Fec* » affectant la prolificité ont été découverts depuis les années 2000 chez les ovins. La partie introductive de ma thèse portera dans un premier temps sur les stratégies de mise en évidence, de localisation et d'identification de gènes majeurs et de leurs mutations affectant la prolificité. Dans un second temps, cette prolificité découlant directement du nombre d'ovulations, mon introduction s'attachera également à présenter les conséquences des mutations de ces gènes majeurs sur la physiologie de la reproduction femelle, la brebis devenant un modèle de choix pour l'étude de cette fonction.



# Introduction

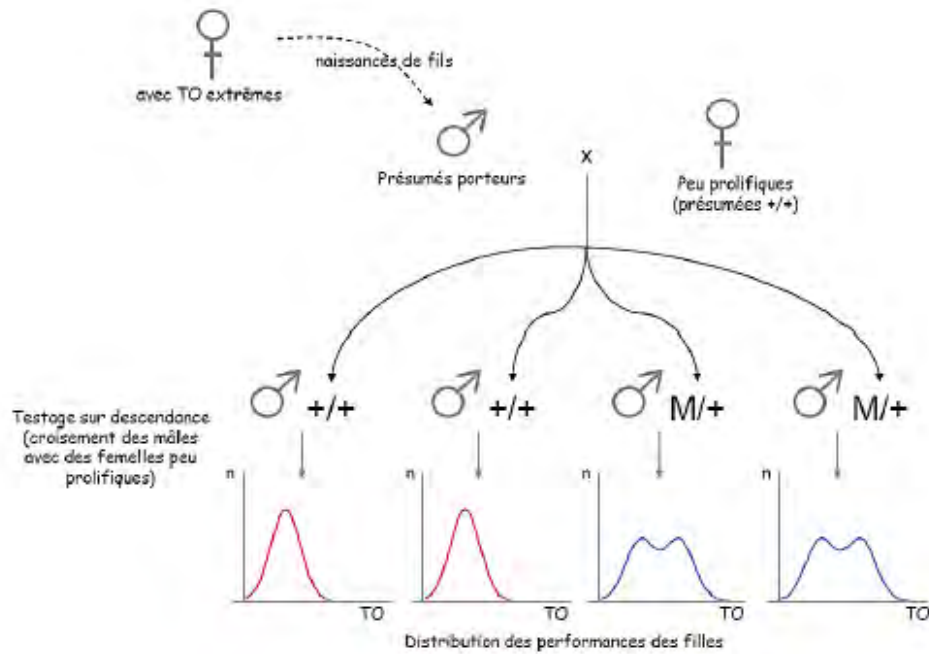


Figure 3: Théorie de l'existence d'un gène majeur, distribution bimodale des performances.

Des mâles présumés porteurs (fils de brebis ayant des TO extrêmes) sont croisés avec des femelles présumées non porteuses +/+ (TO bas). Leurs fils sont testés sur descendance, en croisant des femelles peu prolifiques. Lors de la ségrégation d'un gène majeur, la répartition des performances des filles est soit unimodale (père supposé +/+), soit bimodale (père supposé M/+). TO : taux d'ovulation, n : effectif, M : allèle muté

# I. Stratégies de découverte des gènes majeurs « Fec » influençant le nombre d'ovulations et la prolificité

La première partie de l'introduction présente les différentes stratégies mises en place afin d'identifier des gènes majeurs impliqués dans la régulation du nombre d'ovulations. Le phénotype approchant le plus facilement observable est la prolificité qui résulte directement du nombre d'ovocytes ovulés, mais aussi de l'efficacité de leur fécondation, de l'implantation de l'embryon et de sa survie jusqu'à la naissance. Les premières stratégies génétiques se sont basées sur la création de familles expérimentales à partir d'animaux de prolificités extrêmes à partir des années 1980. C'est au cours de ces travaux qu'il a été mis en évidence des distributions bimodales du taux d'ovulation en accord avec la ségrégation d'une mutation à effet majeur influençant la taille de portée (Figure 3). Avec ce type d'approche, l'identification des premiers gènes majeurs et de leurs mutations causales a pris entre 10 et 20 ans et n'a concerné que très peu de races. La création des familles et le temps intergénérationnel est l'un des facteurs les plus limitants. Par la suite, la recherche de gènes majeurs et de leurs mutations affectant la prolificité s'est élargie à de nombreuses populations ovines en s'appuyant sur des méthodes de génétique quantitative et moléculaire plutôt basées sur les populations commerciales. Grâce à l'identification des premiers gènes majeurs, de leur rôle dans la régulation de la fonction ovarienne et plus particulièrement de la folliculogénèse, en plus des évolutions des techniques de séquençage et d'annotation des génomes, des approches gènes et mutations candidats ont été préférées, permettant parfois d'aboutir à des identifications en quelques mois.

## A. Approches familiales

### 1) Gène *FecB* – mutation Booroola

La mutation Booroola est la première mise en évidence d'un gène majeur affectant la prolificité et aussi la première expérimentation de ce type à avoir été mise en œuvre en ovin. C'est dans les années 1940 que les propriétaires d'un troupeau Mérinos de la ferme de Booroola dans le nord de l'Australie remarquent que leurs brebis avaient plus de naissances multiples que celles de leurs voisins et les ont sélectionnées sur ce caractère. Dès les années 1980, par l'observation par endoscopie du nombre d'ovulations, l'hypothèse d'un déterminisme génétique régulé par un gène

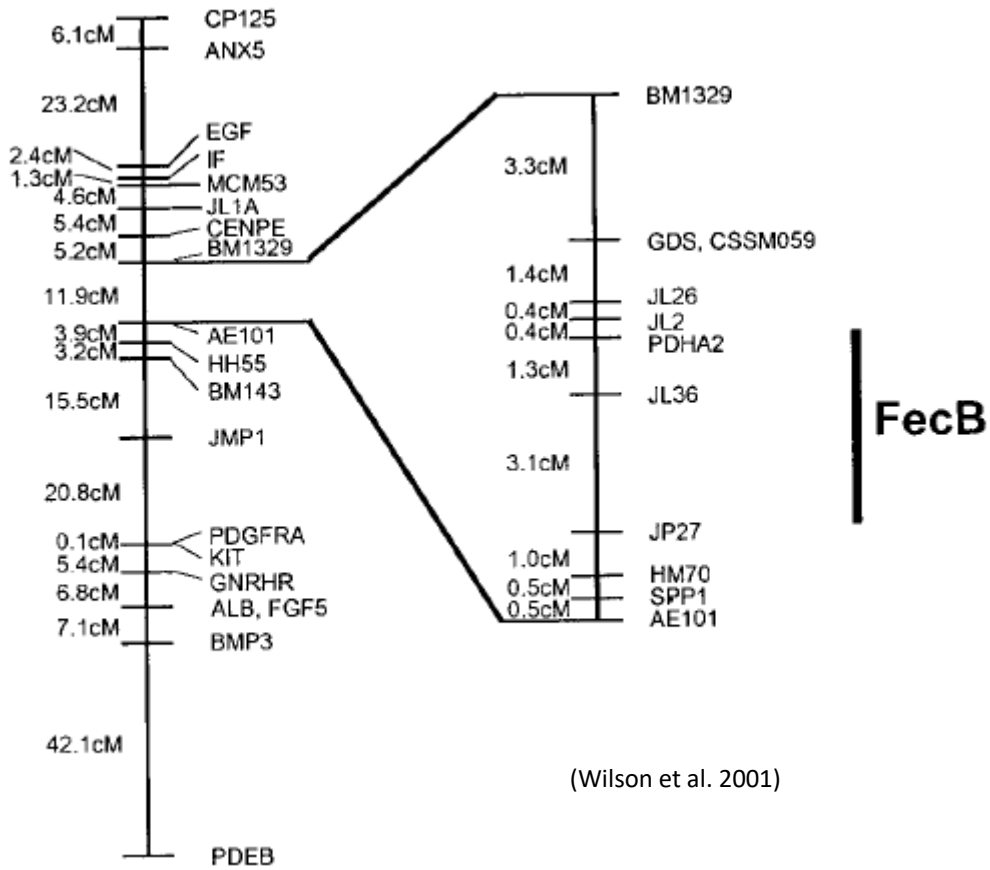


Figure 4: Carte génétique du chromosome 6 ovin et localisation de *FecB*.

majeur autosomal est avancée (Davis et al., 1982; Piper and Bindon, 1982). Ce gène est nommé *FecB* en référence à la dénomination « Fecundity gene » et B pour le gène présent dans la population Booroola. On parlera de l'allèle mutant *FecB<sup>B</sup>* associé à l'hyperprolificité alors que l'allèle sauvage sera noté *FecB<sup>+</sup>*. On retrouvera ce type de nomenclature pour l'ensemble des gènes majeurs de prolificité et leurs mutations décrits dans ce manuscrit. D'un point de vue statistique et en lien avec la probabilité qu'un animal soit porteur de l'allèle muté, il est apparu que *FecB<sup>B</sup>* avait un effet additif sur le nombre d'ovulations ce qui a permis le classement des brebis en fonction du nombre d'ovulations observées. Pour une ou deux ovulations, les brebis ont été classées homozygotes sauvages *FecB<sup>+</sup>/FecB<sup>+</sup>*. Pour des nombres d'ovulations extrêmes, supérieurs ou égaux à 5, elles ont été classées homozygotes mutées *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>*, et hétérozygotes *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>+</sup>* pour un phénotype intermédiaire de 3 à 4 ovulations (Davis et al., 1982). Contrairement aux femelles, les mâles porteurs de *FecB<sup>B</sup>* ne présentent pas de différences phénotypiques par rapport aux mâles sauvages (Bindon, 1984; Hochereau-de Reviers et al., 1997; Smith et al., 1996).

Suite à ces travaux, deux principales équipes, une néo-zélandaise et une française, ont mené en parallèle des approches familiales afin d'identifier le locus *FecB*. La première étude en 1993 a été menée sur 379 descendantes de 12 mâles *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>+</sup>* (génotypes supposés grâce à un testage sur descendance). Un premier groupe de liaison est constitué entre *FecB* et des marqueurs dans les gènes *SPP1* et *EGF* connus pour être localisés sur le chromosome 4 humain dans la région 4q25 (Montgomery et al., 1993). Par la suite, les gènes *PDGFRA* et *CSN1S* (codant pour la caséine  $\alpha_{S1}$ ) ont agrandi le groupe de liaison avec *FecB*.

Chez le mouton, les gènes des caséïnes  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  sont étroitement liés et le gène de la caséïne  $\alpha_{S2}$  a été cartographié sur le chromosome 6 ovin dans la région 6q23-q31. Ils avaient ainsi pu montrer que la mutation Booroola était localisée dans un groupe de gènes conservés qui correspond au chromosome 6 du mouton (Montgomery et al., 1994).

#### a) Stratégie néo-zélandaise de clonage de *FecB*

En se basant sur les résultats précédemment obtenus, l'équipe néo-zélandaise de l'Institut AgResearch a utilisé un dispositif expérimental basé sur l'étude de demi-sœurs (540 filles au total nées de 15 pères homozygotes mutés au locus *FecB* et de mères non porteuses) et de familles en croisement retour de 249 animaux Mérinos sur 3 à 4 générations. Une première région de 4cM a été délimitée en utilisant des microsatellites polymorphes et des marqueurs génétiques connus (Figure 4 ; Wilson et al., 2001). 99% de l'intervalle de confiance couvraient une région de seulement 1,6 cM validant l'hypothèse d'un seul locus majeur. Grâce à l'analyse d'animaux recombinants,





un microsatellite (JL36) à 0 cM de *FecB* a pu être identifié, le désignant comme le marqueur le plus proche et le plus informatif pour *FecB*. Par une stratégie de cartographie comparée de la zone orthologue de *FecB* sur le chromosome 4 humain (Montgomery et al., 1993), le gène *BMPR1B* (Bone Morphogenetic Protein Receptor type 1B) codant pour un récepteur de type 1 de la voie de signalisation des BMP, a été proposé comme candidat. D'une part il fait partie d'un groupe synténique avec d'autres gènes impliqués dans la fonction de reproduction (*KIT* (Nocka et al., 1989) et *EGF* (Bendell and Dorrington, 1990)), et d'autre part l'expression de *BMPR1B* dans l'ovaire et la fonctionnalité du système de signalisation BMP pour le contrôle de la fonction des cellules ovariennes venaient d'être montrées (Shimasaki et al., 1999). Le séquençage du gène chez des animaux porteurs et non porteurs de *FecB<sup>B</sup>* a révélé une mutation dans la région codante de *BMPR1B*. Il s'agit d'un polymorphisme de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism, A>G) en position 830 de l'ADNc du gène *BMPR1B* entraînant un changement d'acide aminé d'une glutamine par une arginine (Q249R) dans une région très conservée du domaine kinase intracellulaire de la protéine. Une carte physique partielle de la région a été développée en utilisant une banque YAC (Yeast Artificial Chromosome) ovine. Le marqueur JL36 et le gène *BMPR1B* sont localisés dans le même YAC.

Afin de valider cette mutation de *BMPR1B* comme la mutation causale, 300 animaux représentatifs des familles expérimentales ont été génotypés par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Le phénotype Booroola et la présence de cette mutation sont parfaitement associés et l'allèle muté n'est pas retrouvé lors du génotypage de 65 animaux de 6 autres races. La mutation p.Q249R dans la protéine BMPR1B est donc causale du phénotype prolifique Booroola. L'effet additif *FecB<sup>B</sup>/BMPR1B<sup>R249</sup>* pour le nombre d'ovulations est confirmé avec une augmentation de 1,6 corps jaunes par cycle et par allèle.

#### b) Stratégie française de clonage de *FecB*

L'équipe française de l'INRA a importé 31 béliers Mérinos australiens supposés hétérozygotes au locus *FecB* qui ont été croisés avec des brebis Mérinos d'Arles, supposées non porteuses, pour un total de 400 filles nées. Le génotype des brebis a été supposé par le nombre d'ovulations selon le même classement que précédemment (5 corps jaunes ou plus, *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>* ; 3 ou 4 corps jaune, *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>+</sup>* ; 1 ou 2 corps jaunes *FecB<sup>+</sup>/FecB<sup>+</sup>* ; (Bindon et al., 1985; Davis et al., 1982). La région de localisation de *FecB* a été caractérisée grâce à des cartes ovines génétiques et physique détaillées. La liaison entre les marqueurs, y compris *FecB*, a été testée sur la population expérimentale de croisement retour. Grâce à la combinaison de l'étude des animaux recombinants

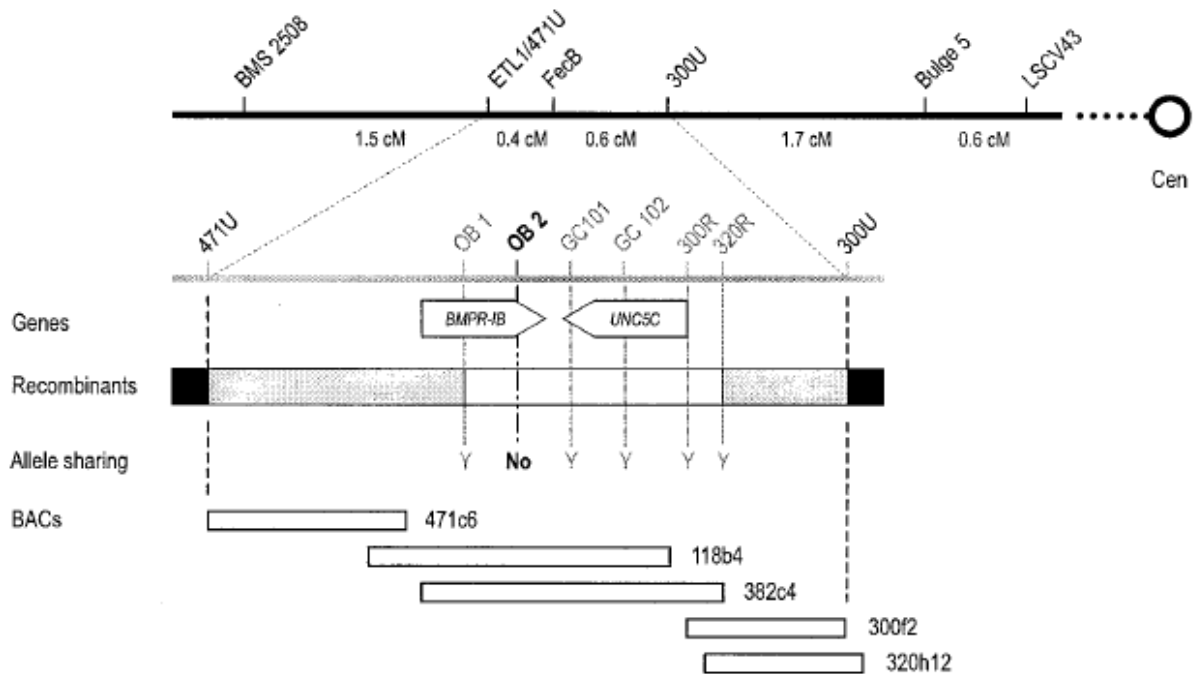


Figure 5: Cartes génétique et physique de la région *FecB* localisée sur le chromosome 6 ovin.

(Mulsant et al. 2011) Le locus *FecB* est encadré par les deux marqueurs pour lesquels un événement de recombinaison a été observé : 471U et 300U. Aucun événement de recombinaison n'a été observé entre *FecB* et les marqueurs OB1, OB2, GC101, GC102, 300R et 320 R. Les flèches correspondent à l'orientation des deux séquences codantes des gènes *BMFR1B* et *UNC5C*. Le nombre de recombinants dans la zone est indiqué par la couleur blanche (aucun recombinant), grise (indéterminé) ou noire (au moins 1 recombinant). Le partage d'allèle entre les animaux non porteurs et porteurs de la mutation *FecB<sup>B</sup>* est indiqué (Yes ou No). Cen : Centromère.

et des données issues de la cartographie comparée avec le chromosome 4 humain, l'intervalle de localisation de *FecB* a été réduit entre les marqueurs microsatellites 471U et 300U, comprenant deux gènes : *BMPR1B* et *UNC5C* (Figure 5). Le même SNP (A>G) dans la séquence d'ADNc de *BMPR1B* a été mis en évidence conduisant à la mutation p.Q249R dans la protéine comme décrit précédemment (Mulsant et al., 2001). Parmi les 190 animaux contrôles de race Mérinos d'Arles et les 120 provenant de 12 autres races, aucun d'entre eux n'était porteur de la mutation. Ces typages ont mis en évidence une association complète de la mutation p.Q249R avec le phénotype hyperprolifique.

Grâce à des approches relativement semblables, les deux équipes ont mis en évidence la mutation *FecB<sup>B</sup>/BMPR1B<sup>Q249R</sup>* simultanément. L'utilisation de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) pour la réalisation de la carte physique par Mulsant et al. (2001) plus détaillée, alors que Wilson et al. (2001) n'avaient à leur disposition que des YAC, est l'une des différences majeures de leurs travaux. Les marqueurs microsatellites ont principalement été utilisés par l'équipe néozélandaise alors que l'équipe française a utilisé des marqueurs SNP. Des études physiologiques ont apporté des éléments de réponse sur l'effet de cette mutation dans *BMPR1B* pour la régulation du nombre d'ovulations. Elles seront présentées dans la partie « *FecB / BMPR1B*, page 36 ».

## 2) Gène *FecX* – mutation Inverdale (*FecX<sup>I</sup>*) et Hanna (*FecX<sup>H</sup>*)

Un profil de ségrégation de gène majeur affectant le nombre d'ovulations a été découvert en étudiant les phénotypes des descendants d'une brebis Romney qui a eu 33 agneaux en 11 portées (Davis et al., 1991). L'allèle prolifique de ce gène majeur a été nommé Inverdale. La particularité de cette mutation est qu'un mâle porteur ne transmet pas la mutation à ses fils mais la transmet à toutes ses filles. De plus, les femelles porteuses de l'allèle prolifique le transmettent à la moitié de leurs descendants, indépendamment du sexe. Ces observations ont permis d'émettre l'hypothèse que le locus Inverdale était localisé sur le chromosome X. Ce gène a donc été nommé *FecX* et l'allèle prolifique Inverdale *FecX<sup>I</sup>*. L'effet de la mutation a été évalué à +1 ovulation et à +0,6 agneau par mise bas sur la taille de portée des brebis hétérozygotes *FecX<sup>I</sup>/FecX<sup>+</sup>* alors que les brebis *FecX<sup>I</sup>/FecX<sup>I</sup>* sont apparues stériles avec des ovaires non développés bloqués au stade primaire de la folliculogénèse (Davis et al., 1992). Le même mode de ségrégation et les mêmes phénotypes (hyperprolificité/stérilité) ont également été observés dans le troupeau Romney de Mac Hanna en Nouvelle Zélande (Davis et al., 2001). La mutation liée à ce troupeau est appelée Hanna, *FecX<sup>H</sup>*.

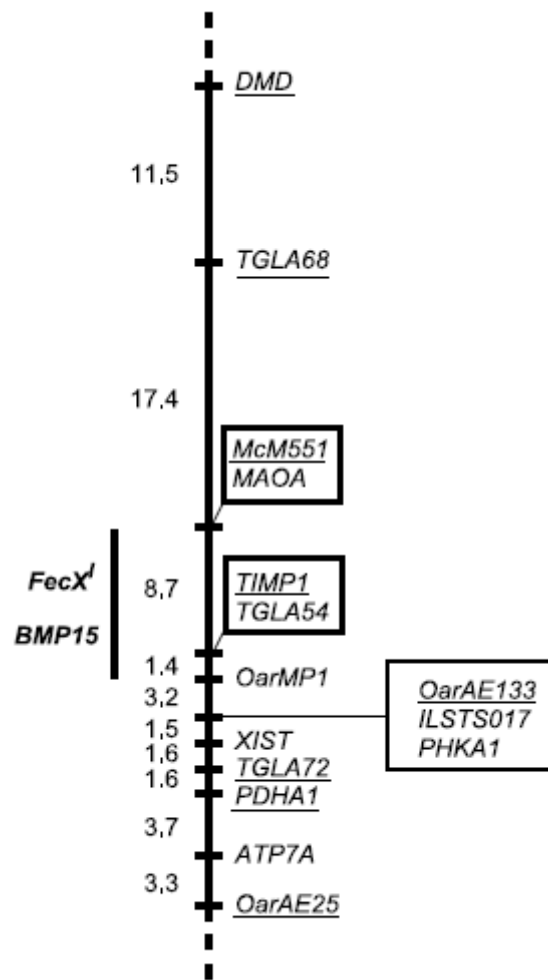


Figure 6: Carte génétique de *FecX'* sur le chromosome X.

(Galloway et al. 2000) Carte de vraisemblance du chromosome X ovin dont les marqueurs soulignés sont ceux dont l'ordre est le plus vraisemblable. Aucun événement de recombinaison n'a été détecté entre les marqueurs dans les rectangles. Les lignes verticales indiquent l'intervalle probable de localisation de *FecX'* et *BMP15*. Les distances sont en centimorgan (cM).

Une carte de liaison génétique du chromosome X a été générée à partir de 177 animaux répartis sur 3 générations (maximum de 96 méioses par femelle) permettant de réduire la taille du locus *FecX<sup>l</sup>* à 10 cM (Figure 6). En utilisant des approches de génétique comparée entre l'homme et la souris, le gène *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein 15) d'expression ovocytaire (Dube et al., 1998) a été identifié comme appartenant aux régions orthologues humaines et murines de la zone de localisation ovine de *FecX<sup>l</sup>*. Suite au séquençage du gène *BMP15* chez les brebis Inverdale et les brebis Hanna, deux polymorphismes différents ont été mis en évidence. La mutation Inverdale *FecX<sup>l</sup>* correspond à un SNP T>A au nucléotide 896 de l'ADNc de *BMP15*. Ce polymorphisme substitue une valine par un acide aspartique en position 299 de la protéine (V299D). La mutation Hanna *FecX<sup>h</sup>* découle d'un SNP C>T en position 871 de l'ADNc de *BMP15* introduisant un codon stop prématuré dans la séquence de la protéine à la place d'un acide glutamique en position 291 (Q291\*). Les mutations Hanna et, par voie de conséquence, Inverdale sont certainement associées à une perte de fonction de la protéine BMP15, avec pour conséquence un blocage des follicules ovariens au stade primaire de la folliculogénèse chez les brebis homozygotes (Galloway et al., 2000).

### 3) Gène *FecG* –mutation Icelandic/Thoka (*FecI<sup>T</sup>* ou *FecG<sup>T</sup>*)

L'origine de cette mutation a été étudiée par Jonmundsson & Adalsteinsson (1984), Adalsteinsson et al. (1989) qui ont identifié une seule femelle nommée Thoka comme ancêtre commun à tous les animaux de cette population. Cette brebis a eu deux fois des triplés à une époque où même les naissances gémellaires étaient assez rares, soulevant l'hypothèse de la ségrégation d'un gène majeur. Il a été nommé *FecI* (Icelandic) et son allèle prolifique Thoka *FecI<sup>T</sup>*. Le gène a été introgressé dans un troupeau de mouton Cheviot au Royaume-Uni (King et al., 1990; Russel et al., 1997). Les Cheviot/Thoka sont phénotypiquement impossibles à distinguer des Cheviots de race pure pour tous les caractères sauf la taille de la portée où la mutation entraîne +0,64 agneau par mise bas (ou +1,2 sur le nombre d'ovulations) chez les brebis hétérozygotes. Des cas de stérilité ont également été enregistrés sur 7 des 46 filles (15,2%) lorsqu'un mâle hétérozygote putatif était croisé avec une femelle hétérozygote putative (Jonmundsson and Adalsteinsson, 1984). Afin d'identifier le gène impliqué, Nicol et al. (2009) ont réalisé une étude de liaison sur le génome entier sur une population comprenant 806 animaux et 982 enregistrements de taille de portée. Cette étude de liaison, réalisée à l'aide de 81 marqueurs microsatellites, a permis d'identifier un locus localisé sur le chromosome 5 contenant en particulier le gène *GDF9* (Growth Differentiation Factor 9) qui est exprimé par l'ovocyte (Elvin et al., 1999). De plus, au cours de l'étude de clonage positionnel du

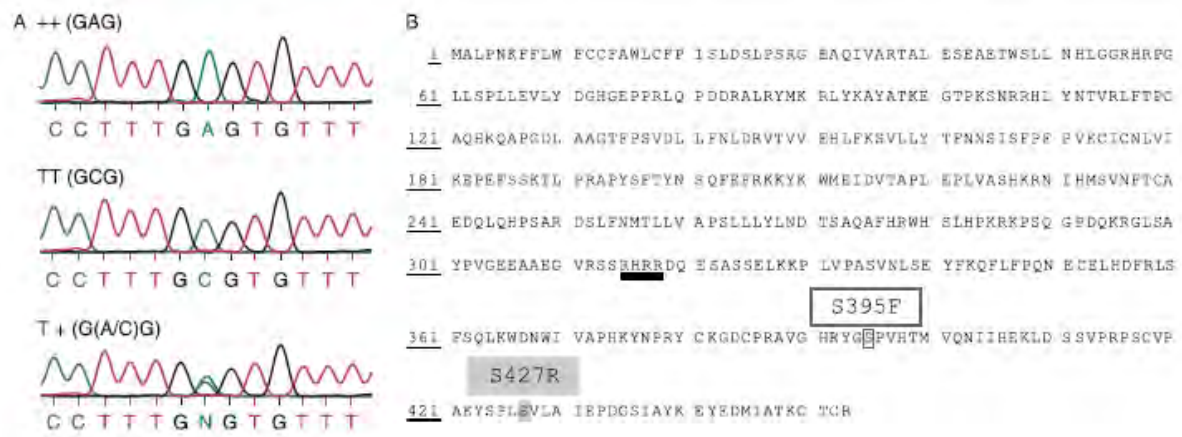


Figure 7: Caractéristiques de la mutation Thoka de GDF9 dans la race Icelandic.

(Nicol et al. 2009) (A) Substitution nucléotidique (A>C) pour la mutation Thoka dans *GDF9* (*FecI<sup>T</sup>*). (B) Séquence d'acides aminés de la protéine GDF9 ovine. Les chiffres au début de chaque ligne indiquent la position des acides aminés. La position de la mutation Thoka *FecI<sup>T</sup>*, S427R (S109R dans le peptide mature) associée au phénotype de stérilité est mise en évidence en gris. La position de la mutation *FecG<sup>H</sup>*, S395F (S77F dans le peptide mature, Hanrahan et al. 2004) est indiquée par le cadre blanc.

locus *FecL*, une mutation influençant le nombre d'ovulations a été publiée dans la séquence codante de *GDF9* (nommée *FecGH*, cf. Mutation High fertility *FecGH* page 15). Les auteurs, étant donné la région de primo localisation de *FecL*, ont donc choisi de mener une approche gène candidat en séquençant le gène *GDF9* sur une sélection d'animaux stériles ou sauvages. Ils ont ainsi mis en évidence le SNP A>C en position 1279 de l'ADNc qui affecte le résidu aminé 427 de la protéine, changeant une sérine (neutre) en une arginine (basique) (Figure 7). Cette substitution S427R est prédite comme affectant la fonction de la protéine (Nicol et al., 2009). Afin de valider le SNP A>C comme mutation causale, ils ont génotypé 390 brebis de la population ayant des enregistrements de taille de portée afin de confirmer l'association entre l'allèle muté et le phénotype hyperprolifique.

De façon intéressante, le gène *GDF9* est le paralogue du gène *BMP15* décrit précédemment, ces gènes étant issus de la duplication d'un gène ancestral (Monestier et al., 2014) et tous les deux sont exprimés préférentiellement dans l'ovocyte (Dube et al., 1998; Elvin et al., 1999; Shimasaki et al., 2003).

#### 4) Gène *FecL* – mutation Lacaune *FecL<sup>L</sup>*

Dans le rameau allaitant de la population de brebis Lacaune françaises, Bodin et al. (2002) par l'observation de la distribution bimodale du taux d'ovulation dans la descendance de certains béliers, ont avancé l'hypothèse que le nombre d'ovulations était sous le contrôle d'un gène majeur autosomal, appelé *FecL*, à effet additif. L'effet de la mutation est estimé à +1,5 ovulation par copie de l'allèle muté, soit +3 ovulations pour une brebis homozygote mutée.

La famille expérimentale utilisée afin de mettre en évidence cette mutation dans la race Lacaune viande a été constituée à partir de 3 béliers (issus de mères très prolifiques) croisés avec des femelles Lacaune du rameau laitier, peu prolifiques et donc considérées non porteuses de la mutation (environ 30 filles par bélier). Douze fils F1 (4 par père) ont également été testés sur descendance (20 brebis par fils) en utilisant un croisement retour sur des mères peu prolifiques. Le nombre d'ovulations des femelles a été enregistré sur plusieurs cycles et à plusieurs moments de l'année pour estimer leur génotype. Une première analyse de 9 demi-frères (représentant 65 méioses) par le génotypage d'un sous ensemble de 30 multiplexes contenant 89 marqueurs a permis d'établir une liaison entre le locus *FecL* et le marqueur IDGVA46 cartographié sur le chromosome 11 ovin (Lecerf and Mulsant, 2002). Pour localiser plus finement le locus *FecL*, une seconde analyse, bénéficiant du développement de nouveaux marqueurs microsatellites et SNP et leurs génotypages sur 189 animaux du dispositif expérimental, a permis de délimiter une région d'environ 1Mb sur le

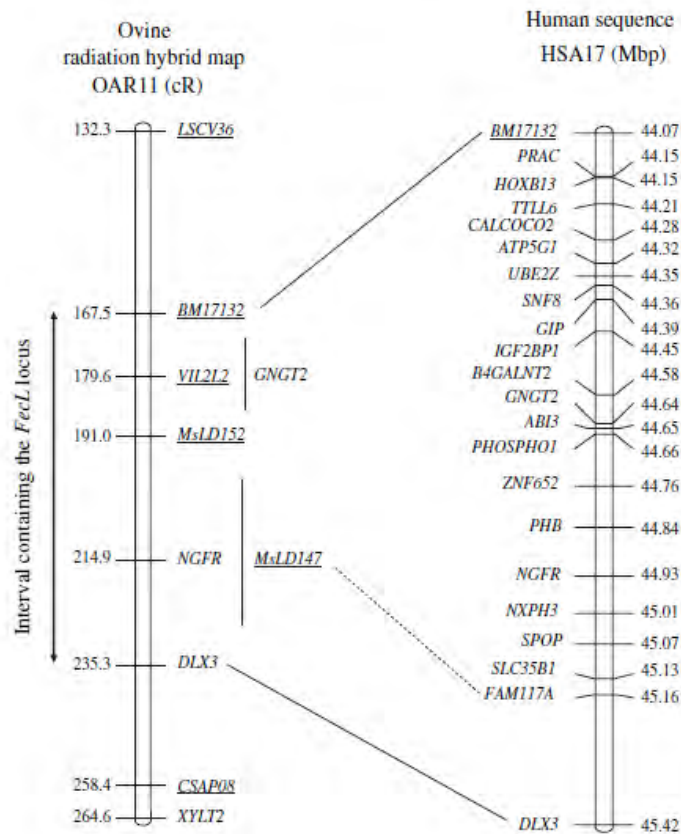


Figure 8: Carte génétique du locus *Fecl* sur le chromosome 11 ovin en comparaison avec le chromosome 17 humain.

(Drouilhet et al. 2009) Comparaison locale de la carte d'hybrides irradiés ovins de OAR11 et de la séquence HSA17 humaine. Les distances sont décrites en centiRay (cR) sur la carte ovine d'hybrides irradiés et en mégabase (Mbp) sur la séquence humaine. Les microsatellites sont soulignés sur la carte d'hybrides irradiés, les huit marqueurs à gauche représentent le cadre. La séquence humaine représente la position des gènes, à l'exception du microsatellite *BM17132*, qui est positionné sur *HSA17* par comparaison orthologue avec la séquence bovine. L'intervalle contenant le locus *Fecl* est représenté par des flèches. Le marqueur *MsLD147* est localisé dans le gène *FAM117A* (ligne pointillée).

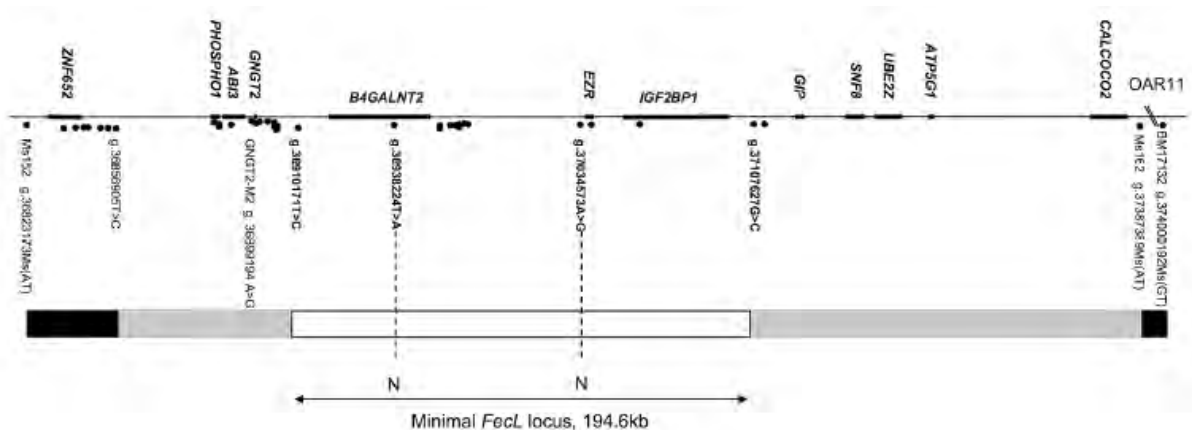


Figure 9: Localisation de la mutation *Fecl<sup>L</sup>* sur le chromosome 11 ovin.

(Drouilhet et al. 2013) Les gènes sont indiqués au-dessus de la ligne, les marqueurs sont indiqués par des points sous la ligne. Le locus *Fecl* (197 kb sur OARv3.1, ou 194.6 kb pour la séquence propre aux auteurs) est flanqué des deux marqueurs recombinants les plus proches, g.36910171 T>C et g.37107627 G>C. Recombinants : rectangle blanc, zone zéro-recombinant : rectangles gris, zone avec un recombinant : rectangles noirs, au moins deux recombinants avec *Fecl<sup>L</sup>*. N : pas de partage d'allèles entre les animaux de type sauvage et les animaux porteurs pour l'allèle *Fecl<sup>L</sup>*.



chromosome 11 (Figure 8, Drouilhet et al., 2009). Cette région est synténique d'une région du chromosome 17 humain (HSA17) contenant une vingtaine de gènes. Durant cette analyse, un SNP localisé dans la séquence 3'UTR du gène *DLX3* après le codon stop (c. \*803A>G) est apparu en très fort déséquilibre de liaison avec la mutation *FecL<sup>L</sup>*, mais le génotypage d'animaux recombinants dans cette région a invalidé ce marqueur en tant que mutation causale.

Avec la mise à disposition de la première séquence de référence du génome ovin (International Sheep Genomics Consortium et al., 2010) et des nouvelles technologies de séquençage à haut débit (Roche 454), un nouvel ensemble de marqueurs génétiques de la région de 1Mb a été développé, de façon à découvrir la mutation causale (Drouilhet et al., 2013). Ainsi, des fragments de PCR de 10kb couvrant la région de 1Mb contenant *FecL* ont été séquencés à partir d'une brebis hétérozygote *FecL<sup>L</sup>/FecL<sup>+</sup>* et deux brebis homozygotes *FecL<sup>+</sup>/FecL<sup>+</sup>* et *FecL<sup>L</sup>/FecL<sup>L</sup>*. Le génotypage avec les marqueurs informatifs de deux brebis recombinantes a permis de réduire le locus à 197 kb, ne comprenant plus que deux gènes prédits codant pour les protéines B4GALNT2 (beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 2) et IGF2BP1 (insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 1 ; Figure 9). Dans cette région minimale, seuls 2 SNPs en déséquilibre total de liaison ségrégent en tant que mutation *FecL<sup>L</sup>*, et donc complètement associés au phénotype hyperprolifique : le SNP g.36938224T>A, localisé dans l'intron 7 de *B4GALNT2*, et le SNP g.37034573A>G localisé dans la séquence intergénique entre *B4GALNT2* et *IFG2BP1*, proche du pseudogène *EZR-like* (Figure 9). Le total déséquilibre de liaison entre ces deux polymorphismes ne permet pas de connaître la mutation causale avec certitude. Cependant, *B4GALNT2* est apparu comme le meilleur candidat positionnel, expressionnel et fonctionnel pour *FecL<sup>L</sup>* en lien avec la fonction ovarienne (cf. paragraphe : Conséquences de la mutation *FecL/B4GALNT2* associée à l'hyperprolificité sur la fonction ovarienne, page 45 ; Drouilhet et al., 2013).

## B. Approche mutations et/ou gènes candidats

En regard des approches familiales, coûteuses en temps pour la création des familles et en argent pour l'élevage d'un grand nombre d'animaux, certains auteurs ont engagé une approche « gène candidat » ou encore « mutation candidate ». La stratégie « candidat » consiste à rechercher et analyser les variants génétiques en lien avec le caractère étudié soit directement en testant les mutations déjà décrites dans la littérature soit en cherchant de nouveaux polymorphismes dans les gènes déjà identifiés ou dans des gènes de la même famille.



## 1) *BMPR1B* – *FecB*

### a) Gène *FecB* – mutation Booroola *FecB<sup>B</sup>*

En parallèle des études familiales réalisées pour le clonage positionnel de *FecB* (Mulsant et al., 2001; Wilson et al., 2001), Souza et al. (2001) ont mené une approche « gène candidat ». Pour cela, les informations de primo-localisation de *FecB* sur le chromosome 4 humain (Montgomery et al., 1993) ont été croisées avec les informations bibliographiques disponibles chez la rate montrant que le système de signalisation cellulaire des BMP (ligands et récepteurs) était exprimé dans l'ovaire et pouvait en moduler sa fonction (Shimasaki et al., 1999). Ainsi, parmi plus de 50 gènes connus appartenant au système de signalisation cellulaire des BMP et autres molécules apparentées (GDF, TGFbeta ou encore Activine), seul le gène codant le récepteur *BMPR1B* était présent dans la région de localisation de *FecB*.

Ainsi, ils ont séquencé et comparé les ADNc de *BMPR1B* issus d'ovaires de 5 brebis supposées homozygotes mutées à ceux de 5 brebis sauvages de la race Scottish Blackface croisée Merino créée pour introgresser *FecB*. Ils ont mis en évidence le même polymorphisme A>G créant la mutation Q249R dans le récepteur *BMPR1B*. La confirmation de la mutation a été réalisée par les typages supplémentaires de 10 brebis d'un troupeau local et de 10 brebis provenant d'un troupeau brésilien indépendant (de manière à vérifier l'absence d'un effet fondateur). Cette étude a donc été menée uniquement par une stratégie « gène candidat », sans approche familiale et sur un nombre très réduit d'animaux. Les approches de génétique moléculaire ont permis de développer des tests ADN sur la base de l'identification de la mutation Booroola *FecB<sup>B</sup>* afin de rechercher des individus porteurs dans diverses populations ovines pour lesquelles la ségrégation de mutations à effet majeur sur la prolificité était supposée (Davis et al., 2002, 2006). Ainsi *FecB<sup>B</sup>* a été retrouvée en races Garole (Inde) et Hu (Chine), où la mutation est fixée dans ces populations, mais aussi en ségrégation dans les races Javanese (Indonésie) et Han (Chine).

Il est supposé que la mutation *FecB<sup>B</sup>* découverte initialement en Mérinos australien aurait été introduite à la fin du 18<sup>ème</sup> siècle à partir de moutons Garole (Davis et al., 2002). Bien évidemment, le génotypage spécifique de la mutation *FecB<sup>B</sup>* a largement contribué au développement des programmes d'introgression à partir des Mérinos australiens (et plus récemment à partir des Garole, Hu et Han) pour améliorer la prolificité d'une quarantaine de races à travers le monde (Walkden-Brown et al., 2009).



## 2) BMP15 – FecX

### a) Mutations Galway *FecX<sup>G</sup>* et Belclare *FecX<sup>B</sup>*

Les populations Belclare et Cambridge sont des races de moutons prolifiques et la variation du nombre d'ovulations chez les deux races est compatible avec la ségrégation d'un gène majeur (Hanrahan, 1991). De plus, des brebis stériles sont présentes dans les deux populations avec une hypoplasie ovarienne comme celle rencontrée dans les populations Inverdale et Hanna, ciblant potentiellement un déterminisme génétique en lien avec le gène *FecX/BMP15*. Ainsi, par le séquençage systématique des deux exons de *BMP15* chez des brebis stériles dans les populations Belclare et Cambridge, deux nouvelles mutations ont été identifiées. Ces deux mutations appelées *FecX<sup>G</sup>* (Galway) et *FecX<sup>B</sup>* (Belclare) sont respectivement, un SNP C>T en position 718 de l'ADNc de *BMP15*, créant un codon stop prématuré à l'acide aminé 239 (Q239\*) et un SNP G>T en position 1100 de l'ADNc entraînant la substitution d'une sérine par une isoleucine en position 367 de la protéine mature (S367I).

Ces deux mutations sont associées à une augmentation du nombre d'ovulations chez les brebis hétérozygotes (+0,77 en Belclare à +1,18 en Cambridge pour *FecX<sup>G</sup>*, et +2,38 chez Belclare pour *FecX<sup>B</sup>*) et à une stérilité chez les brebis homozygotes confirmant le phénotype initial. En race Belclare où ségrégent les deux mutations, les double-hétérozygotes sont aussi stériles (Hanrahan et al., 2004).

### b) Mutation Lacaune *FecX<sup>L</sup>*

Comme indiqué précédemment, en population Lacaune allaitante, dès 2002 Bodin et al. (2002) ont mis en avant la ségrégation d'un gène majeur autosomal *FecL*, finalement identifié en 2013 (Drouilhet et al., 2013). Cependant, l'existence de la mutation *FecL* ne permettait pas d'expliquer la totalité de tous les phénotypes hyperprolifiques observés. En effet, certaines brebis étaient hyperprolifiques mais non porteuses de l'haplotype muté contenant *FecL<sup>L</sup>*. D'autres brebis étaient porteuses de l'haplotype muté, mais leurs performances étaient si élevées (avec un nombre d'ovulations supérieur à 12) que leur phénotype était difficilement explicable par la seule présence de *FecL<sup>L</sup>*. Ces observations ont donc suggéré la présence d'une seconde mutation affectant le nombre d'ovulations dans la population Lacaune. Les récentes découvertes dans les gènes *FecB/BMP1B*, *FecG/GDF9* et *FecX/BMP15* ont amené à chercher parmi ces 3 gènes des polymorphismes chez des brebis hyperovulantes suivies par endoscopie (Bodin et al., 2007). Un seul polymorphisme de type SNP (G>A) a été mis en évidence associé au phénotype d'ovulation.

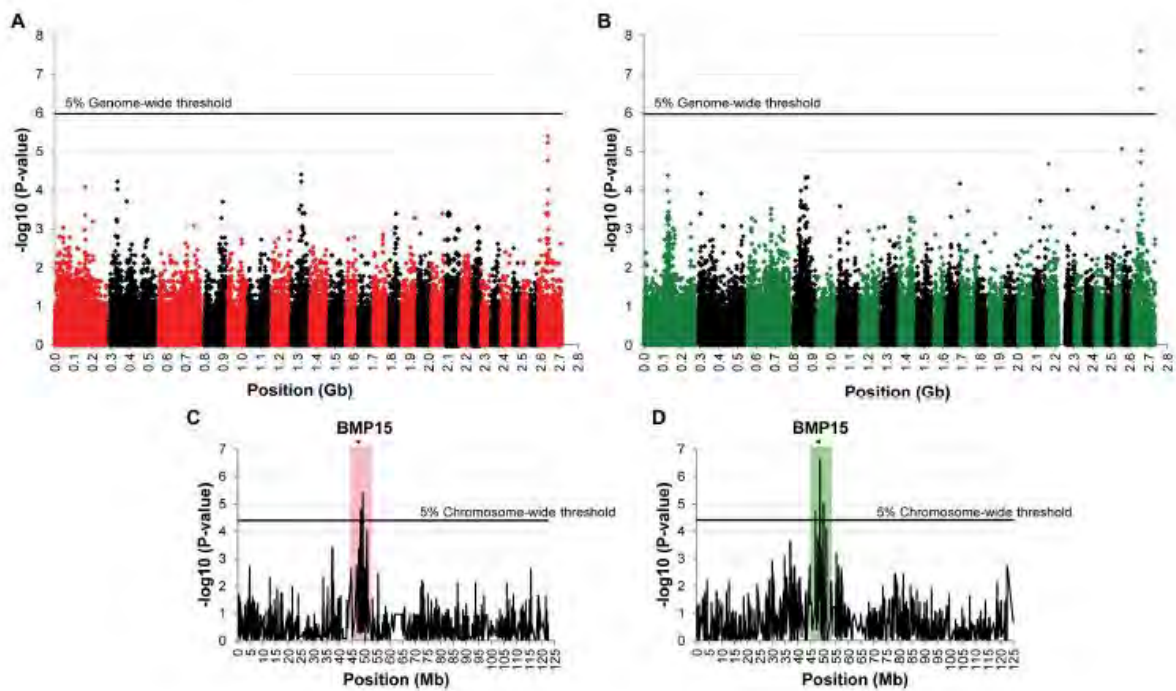


Figure 10: Résultats d'analyses d'association à l'échelle du génome et du chromosome X pour les mutations *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecX<sup>0</sup>*.

(Demars et al. 2013) (A) Résultats d'association pangénomique pour la taille de portée dans la population française de moutons Grivette. (B) Résultats d'association pangénomique pour le nombre d'ovulations dans la population de moutons Olkuska en Pologne. Les diagrammes représentent la significativité du test statistique ( $-\log_{10}$  (p-valeur)) pour chaque position de SNP dans le génome du mouton (OAR\_v2.0). Les lignes noires représentent le seuil de significativité au niveau génomique. Les chromosomes sont classés de OAR1 à OAR26, puis OARX. Résultats d'association à l'échelle du chromosome OARX pour la taille de portée dans la population Grivette (C) ou du nombre d'ovulations dans la population Olkuska (D). Les lignes noires représentent le seuil de significativité au niveau chromosomique. La localisation du gène *BMP15* est indiquée par une flèche.

Il est situé dans le second exon du gène *BMP15* (en position 962 de l'ADNc) qui entraîne la substitution du résidu cystéine en position 321 de la protéine par une tyrosine (C321Y). D'après la nomenclature utilisée, la mutation a été appelée *FecX<sup>L</sup>*. Les brebis hétérozygotes *FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>+</sup>* présentent une augmentation du nombre d'ovulations de l'ordre de 1,5 alors que les brebis homozygotes *FecX<sup>L</sup>/FecX<sup>L</sup>* sont stériles et montrent un phénotype d'hypoplasie ovarienne identique à celui observé chez les brebis Inverdale, Hanna, Cambridge ou Belclare. La race Lacaune, à l'instar de la race Belclare est la première race en France où deux mutations de prolificité ségrégent.

### c) Mutations Grivette *FecX<sup>Gr</sup>* et Olkuska *FecX<sup>O</sup>*

Martyniuk and Radomska (1991) ont étudié la population polonaise Olkuska. Ils ont classé leurs brebis en fonction de leur nombre d'ovulations (hétérozygotes pour celles qui avaient au moins une fois un nombre d'ovulations  $\geq 3$ , homozygotes mutées pour celles qui avaient au moins une fois un nombre d'ovulations  $\geq 5$ ) et ont estimé que l'effet d'une copie du gène était d'environ un ovocyte supplémentaire par ovulation. La petite taille de la population (classée race en danger) a ralenti l'identification du gène Olkuska (Davis, 2005). En parallèle de ces travaux, la race Grivette a également été étudiée car elle présente un phénotype de prolificité similaire, et aucun cas de stérilité n'a été observé. Les mutations déjà identifiées affectant les 3 gènes *BMPR1B*, *GDF9* et *BMP15* ont été testées mais non retrouvées. La recherche des mutations causales dans ces deux races a bénéficié du progrès des techniques de génomique avec la disposition de puces ovines de génotypage SNP à haute densité (Ovine 50k SNP chip, Illumina, développée par le consortium international de génomique ovine) et le développement des modèles d'analyse de liaison comme le GWAS (Genome-Wide Association Study). Avec ces approches dites « tout génome » et une stratégie de comparaison d'animaux extrêmes en terme de prolificité dites « cas/contrôle » (les cas étant des brebis hyperprolifiques), les analyses GWAS menées sur 63 brebis Olkuska (29 cas et 34 contrôles) et 39 brebis Grivette (28 cas et 11 contrôles) ont mis en évidence des signaux significatifs d'association du phénotype hyperprolifique sur le chromosome X à proximité du gène candidat *FecX/BMP15* (Figure 10 ; Demars et al., 2013). Le séquençage des 2 exons de ce gène dans les deux races a mis en évidence plusieurs polymorphismes dans la séquence codante de *BMP15*. Mais seuls les SNP c.950C>T en race Grivette et c.1009A>C en race Olkuska, conduisant respectivement aux substitutions non-conservatives T317I et N337H montrent une association significative avec le phénotype de prolificité et de nombre d'ovulations. Dans les deux races, des animaux supplémentaires (360 en Grivette et 103 en Olkuska) ont été phénotypés et génotypés pour confirmer la causalité des deux mutations respectivement nommées *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecX<sup>O</sup>*.





L'effet de ces mutations n'a pas été complètement estimé mais des augmentations de +0,10 agneau par mise-bas pour la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* et de +0,62 agneau par mise-bas pour la mutation *FecX<sup>O</sup>* ont été observées chez les brebis hétérozygotes. De façon intéressante, les brebis homozygotes ainsi mutées dans *BMP15* ne sont pas stériles en comparaison aux mutations *FecX<sup>I</sup>* et *FecX<sup>H</sup>*. Leur prolificité est encore augmentée avec +0,57 et +1,26 agneau par portée respectivement par rapport aux porteuses hétérozygotes. Très récemment, la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* a été retrouvée dans les races Romanov, Dorper et Ovella Galega par une approche gène candidat en séquençant l'exon 2 de *BMP15*. L'effet de la mutation et la fréquence dans ces populations n'ont pas été estimés (Vera et al., 2018).

#### d) Mutation Aragonaise *FecX<sup>R</sup>* et Barbarine *FecX<sup>Bar</sup>*

Au début des années 1990, un programme de sélection sur la prolificité des brebis espagnoles de race Aragonaise (Rasa Aragonesa) a permis d'améliorer très largement ce caractère dans la population. Les analyses de cette sélection ont conduit à émettre l'hypothèse de la ségrégation d'un gène majeur lié au chromosome X (Martinez-Royo et al., 2008). Cette liaison au chromosome X et les nombreuses mutations déjà publiées de *FecX/BMP15* les ont amenés à séquencer le gène *BMP15* dans leur population, sans pour autant avoir observé l'existence de brebis stériles. Ils ont découvert une délétion de 17 bases entre les positions 525 et 541 de l'ADNc. Cette délétion provoque une altération de la séquence protéique à partir de l'acide aminé 154 et entraîne un codon stop prématuré. Grâce à l'identification de cette mutation, nommée *FecX<sup>R</sup>*, associée aux performances élevées de leurs brebis (les brebis hétérozygotes ont en moyenne +1,3 corps jaunes par cycle), ils ont recherché des brebis homozygotes mutées qui se sont avérées être stériles. Dans le même temps, Monteagudo et al. (2009) ont étudié les gènes candidats *FecX/BMP15* et *FecG/GDF9* dans leur population de brebis aragonaises, en sélectionnant 12 femelles avec de très hautes performances ainsi que 5 mâles. Aucun polymorphisme associé aux performances élevées n'a été détecté dans le gène *GDF9*. Cependant, ils ont aussi trouvé la même mutation *FecX<sup>R</sup>* dans *BMP15*. Dans cette étude, aucune femelle homozygote mutée n'était disponible pour vérifier la fertilité des brebis homozygotes mutées. Par ailleurs en Tunisie, un troupeau de mouton Barbarine, nommé « W » a été créé et sélectionné sur la prolificité. Suite à l'observation de brebis hyperprolifériques mais aussi stériles dans ce troupeau, l'hypothèse de ségrégation d'une mutation dans les gènes candidats *FecX/BMP15* ou *FecG/GDF9* paraissait plausible. Les deux exons des deux gènes *BMP15* et *GDF9* ont été séquencés et un polymorphisme complexe a été identifié dans *BMP15* en lien avec les phénotypes de prolificité et stérilité. Il s'agit de la combinaison d'un SNP (c.301G>T),

Tableau 2 : Polymorphismes dans GDF9 et BMP15 dans les races Cambridge et Belclare.

Gene	Variant <sup>a</sup>	Base change	Coding base (bp)	Coding residue (aa)	Mature peptide residue (aa)	Amino acid change
GDF9	G1	G-A	260	87		Arg (R)-His (H)
	G2	C-T	471	157		Unchanged Val (V)
	G3	G-A	477	159		Unchanged Leu (L)
	G4	G-A	721	241		Glu (E)-Lys (K)
	G5	A-G	978	326	8	Unchanged Glu (E)
	G6	G-A	994	332	14	Val (V)-Ile (I)
	G7	G-A	1111	371	53	Val (V)-Met (M)
	<b>G8</b>	<b>C-T</b>	<b>1184</b>	<b>395</b>	<b>77</b>	<b>Ser (S)-Phe (F)</b>
BMP15	B1	CTT del	28-30	10		Leu deletion
	<b>B2</b>	<b>C-T</b>	<b>718</b>	<b>239</b>		<b>Gln (Q)-STOP</b>
	B3	T-C	747	249		Unchanged Pro (P)
	<b>B4</b>	<b>G-T</b>	<b>1100</b>	<b>367</b>	<b>99</b>	<b>Ser (S)-Ile (I)</b>

<sup>a</sup> The variants in bold are associated with sterility. (Hanrahan et al. 2004)

```

1  MALPNKFFLW FCCFAWLCFP ISLDSLPSRG EAQIVARTAL ESEAETWSSL
                                     R87H [G1]
                                     ▽
51  NHLGGRHRPG LLSPLLEVLY DGHGEPRLQ PDDRALRYMK RLYKAYATKE
                                     ▼
101 GTPKSNRRHL YNTVRLFTPC AQHKQAPGDL AAGTFPSVDL LFNLDRTVTV
151 EHLFKSVLLY TFNNSISFPF PVKICNLVI KEPEFSSKTL PRAPYSFTYN
                                     E241K [G4]
                                     ▽
201 SQFEFRKKYK WMEIDVTAPL EPLVASHKRN IHMSVNFTCA EDQLQHPSAR
251 DSLFNMTLLV APSLLLLYLND TSAQAFHRWH SLHPKRKPSQ GPDQKRGLSA
                                     (I)
                                     V332I [G6]
                                     ▽
301 YPVGEEAAEG VRSSRHRRDQ ESASSELKKP LVPASVNLSE YFKQFLFPQN
                                     V371M [G7]
                                     ▽
                                     S395F [G8]
351 ECELHDFRLS FSQLKWDNWI VAPHKYNPRY CKGDCPRAVG HRYGSPVHTM
401 VQNIIEKLD SSVPRPSCVP AKYSPLSVLA IEPDGSIAVK EYEDMIATKC
                                     (135)

```

Figure 11: Séquence protéique de GDF9 et positions des substitutions créées par des SNPs.

(Hanrahan et al. 2004) Les positions des acides aminés dans le peptide mature sont entre parenthèses. Le site RHRR de clivage est en gris. Le triangle noir indique la position de l'unique intron du gène. Les triangles blancs indiquent les positions des mutations qui confèrent des substitutions d'acides aminés mais qui ne sont pas associés au phénotype de stérilité. La position du SNP G8 (*FecG<sup>H</sup>*) associé à de la stérilité est en noir.

d'une délétion (c.302\_304 del CTA) et d'une insertion (c.310 ins C) sur un intervalle de 10 nucléotides qui conduit à un changement du cadre de lecture en position 101 de la protéine. La mutation est nommée *FecX<sup>Bar</sup>* (Lassoued et al., 2017). Cependant, l'allèle *FecX<sup>Bar</sup>* n'a pas été trouvé chez les femelles de Barbarine prises au hasard dans des troupeaux commerciaux.

Néanmoins, une étude précédente avait montré la ségrégation d'une mutation déjà connue, *FecX<sup>B</sup>*, dans cette race (Jemmali et al., 2012), mais non retrouvée dans le troupeau « W ».

### 3) GDF9 – FecG

#### a) Mutation High fertility *FecG<sup>H</sup>*

Comme indiqué précédemment, les races de moutons prolifiques Belclare et Cambridge sont porteuses de mutations dans le gène *FecX/BMP15*. Cependant, des analyses statistiques antérieures et une étude du phénotype d'hypoplasie ovarienne ont également permis d'avancer l'hypothèse de la ségrégation d'une mutation portée par un autosome (Hanrahan, 1991). C'est l'information bibliographique disponible chez la souris qui a permis d'orienter la stratégie gène candidat vers *GDF9*. En effet, les souris knockout (KO) pour *GDF9*, le plus proche homologue de *BMP15*, sont stériles à cause d'un blocage dans le développement folliculaire au stade primaire (Dong et al., 1996). De plus, *GDF9* (comme *BMP15*) présente une expression ovarienne restreinte à l'ovocyte (Bodensteiner et al., 1999; Elvin et al., 2000; Jaatinen et al., 1999). Il est à noter que de manière assez surprenante, *BMP15* ne paraît pas être crucial pour la folliculogénèse chez la souris, puisque des souris KO pour ce gène sont fertiles, même si la fertilité est quelque peu réduite (Yan et al., 2001). Ainsi, les deux exons de *GDF9* ont été séquencés pour 9 brebis Cambridge et 10 brebis Belclare stériles. Huit polymorphismes de type SNP ont été identifiés dans la séquence codante (notés G1-G8 ; Tableau 2). Cinq d'entre eux entraînent des substitutions d'acides aminés dans la protéine GDF9, mais seulement trois sont non-conservatives (Tableau 2 et Figure 11).

Au final, les brebis stériles ne sont porteuses à l'état homozygote que du polymorphisme G8 C>T en position 1184 de l'ADNc. Ce polymorphisme crée la substitution d'une sérine par une phénylalanine à la position 395 de la protéine mature (S395F) (Hanrahan et al., 2004). La présence de cette mutation à l'état hétérozygote augmente le nombre d'ovulations de 1,8 chez les brebis Belclare et de 2,3 chez les brebis Cambridge. En parallèle, l'association de la mutation et du phénotype d'hyperprolificité a été vérifiée chez les femelles issues du testage sur descendance de 10 mâles. Cette nouvelle mutation dans *GDF9* a été nommée *FecG<sup>H</sup>* (High fertility). Avec la découverte de cette mutation, il apparaît que 3 mutations différentes (*FecX<sup>G</sup>*, *FecX<sup>B</sup>* et *FecG<sup>H</sup>*)

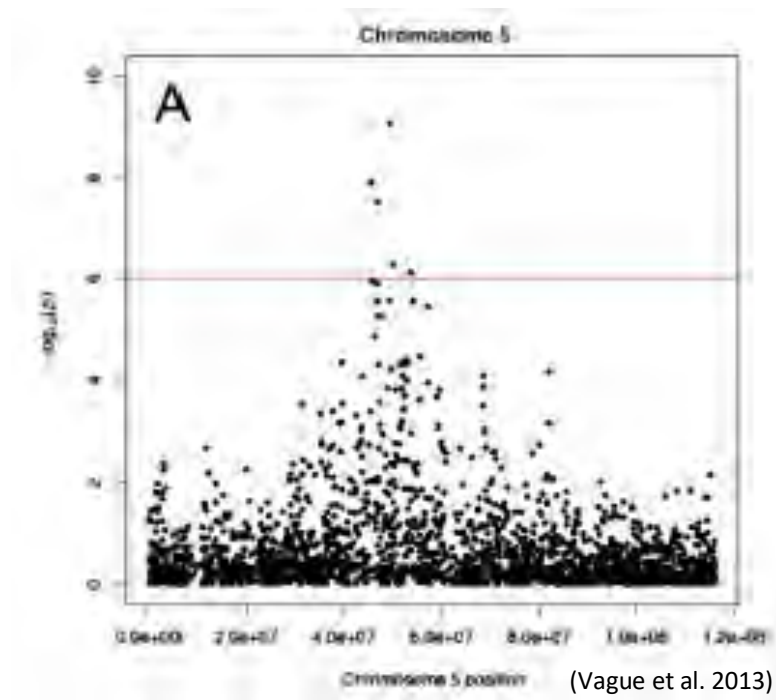


Figure 12: Graphique d'association entre les SNPs du chromosome 5 et la taille de portée sur dans la race Norwegian White Sheep.

Les positions chromosomiques sont indiquées en paires de bases (pb) sur l'axe des abscisses, tandis que le  $-\log_{10}$  de la valeur du rapport de vraisemblance est présenté sur l'axe des ordonnées. Le graphique est affiché sans le SNP c.1111 G>A dans *GDF9*.

sont en ségrégation dans la race composite Belclare et expliquent son extrême prolificité. En recherchant l'origine de ces mutations dans les races originelles ayant servi à constituer la race Belclare, il est apparu que *FecX<sup>G</sup>* et *FecG<sup>H</sup>* provenaient de la race galloise Lleyn (Mullen et al., 2013).

#### b) Mutation Norwegian White Sheep *FecG<sup>NWS</sup>*

Une analyse d'association a été réalisée sur 378 béliers Norwegian White Sheep (NWS) grâce à leur génotypage sur une puce 50k SNP ovine (Våge et al., 2013). Une région significativement associée à leur valeur génétique pour la prolificité a été identifiée sur le chromosome 5 du mouton, proche de *FecG/GDF9* (Figure 12). Le séquençage de la région codante de *GDF9* chez les béliers les plus extrêmes (valeurs génétiques les plus hautes et les plus basses) a révélé un polymorphisme nucléotidique unique (c.1111G>A), responsable d'une substitution Valine vers Methionine en position 371 (V371M). Ce polymorphisme avait déjà été identifié (G7) chez les moutons Belclare et Cambridge, mais il n'avait pas été associé au phénotype de prolificité (Hanrahan et al., 2004). Dans la population NWS, le SNP c.1111G>A montre une association plus forte avec la taille de la portée que tout autre SNP unique sur la puce SNP ovine. De plus, les béliers homozygotes pour la mutation ont une valeur génétique estimée plus élevée (+0,46 à +0,57 agneau par rapport aux non porteurs), tandis que l'effet de l'hétérozygote est intermédiaire (+0,20 à +0,25 agneau). Ce même SNP (c.1111G>A) dans *GDF9* a été détecté ensuite en race prolifique Finnsheep soit par un génotypage systématique des mutations connues (Mullen and Hanrahan, 2014) soit par une approche très globale de séquençage complet de 96 génomes de plusieurs races (Heaton et al., 2017).

#### c) Mutation Embrapa *FecG<sup>E</sup>*

Vingt-trois brebis appartenant à la population Santa Inês ont été étudiées avec des antécédents de naissances multiples (naissances de jumeaux ou de triplés). La mutation Booroola *FecB<sup>B</sup>* n'a pas été retrouvée et donc les exons 2 des gènes *BMP15* et *GDF9* ont été séquencés pour rechercher des polymorphismes. Sept SNPs dont certains déjà décrits précédemment par Hanrahan et al. (2004) ont été identifiés dans *GDF9*. Parmi ces polymorphismes, un nouvel SNP c.1034T>G créant une substitution non-conservative d'une phénylalanine vers une cystéine en position 345 (F345C) est détectée chez 43% des 23 brebis testées. Cette mutation est nommée Embrapa, *FecG<sup>E</sup>* (Silva et al., 2010). Dans la population générale, la mutation est présente à 19,2% pour une augmentation de +0,31 agneau à l'état hétérozygote. *FecG<sup>E</sup>* est également la première mutation décrite dans *GDF9* qui ne cause pas de stérilité chez les brebis homozygotes mais une augmentation encore plus importante, de +0,65 agneau par rapport à des brebis non porteuses.



#### d) Mutation Vacaria *FecG<sup>V</sup>*

L'analyse de données de naissances triples dans des élevages ovins au Brésil a permis d'émettre l'hypothèse de la ségrégation d'un gène majeur de prolificité dans des élevages français de brebis Ile-de-France. En effet, ces animaux sont génétiquement liés à la population française suite à l'importation de semence de béliers Ile-de-France. Dans un premier temps, les mutations *FecB<sup>B</sup>* et *FecG<sup>E</sup>*, déjà montrées ségrégeant dans d'autres races brésiliennes (Souza et al., 2009) ont été génotypées mais non trouvées dans une sélection de 25 brebis françaises Ile-De-France sélectionnées pour leurs mise-bas multiples. Le séquençage des gènes *GDF9* et *BMP15* a révélé un nouveau polymorphisme (c.943C>T) dans l'ADNc de *GDF9* chez 2 de ces animaux. Ce SNP entraîne une substitution non conservative de type p.Arg315Cys dans la protéine. Ce nouvel allèle s'appelle Vacaria, et la mutation est dénommée *FecG<sup>V</sup>*. Un troupeau de brebis demi-sœurs a été évalué pour le nombre d'ovulations au cours des trois premières saisons de reproduction et les hétérozygotes *FecG<sup>V</sup>/FecG<sup>+</sup>* présentaient un nombre d'ovulations supérieur (2,1 contre 1,2) par rapport aux brebis non porteuses, se traduisant par une taille de portée supérieure de +0,32 agneau. L'analyse de la morphologie de l'appareil reproducteur des brebis homozygote mutées a révélé une hypoplasie utérine et ovarienne associée à l'infertilité de ces femelles. Les follicules ovariens continuent à se développer jusqu'à un stade de petit antrum, avec une morphologie de l'ovocyte et une disposition des cellules de la granulosa anormales (Souza et al., 2014).

#### 4) *B4GALNT2* – *FecL*

Avec l'augmentation croissante du nombre de génomes ovins séquencés et disponibles dans les banques de données et la mise à disposition de l'ensemble des variants détectés, il est assez aisé de rechercher des variants causaux connus. Cette stratégie a été utilisée pour les mutations connues de prolificité ovine à partir des données de séquences ovines publiques du projet européen NextGen (<https://projects.ensembl.org/nextgen>). Dans cette base de données, les variants d'un ensemble de 180 génomes sont disponibles pour des races Irlandaises et Marocaines. C'est ainsi que parmi toutes les mutations connues dans *BMP15*, *GDF9*, *BMP1B* et *B4GALNT2*, seule la mutation *FecL<sup>L</sup>* dans *B4GALNT2* a été mise en évidence dans la race D'man marocaine, bien connue pour sa prolificité élevée. La ségrégation de la mutation *FecL<sup>L</sup>* a été ensuite démontrée dans un échantillonnage spécifique de brebis D'Man de la population tunisienne, montrant une fréquence de 65% de brebis porteuses (Ben Jemaa et al., 2018). L'effet de *FecL<sup>L</sup>* sur la prolificité avec +0,30 agneau/portée est assez proche de celle observée en race Lacaune (+0,45).





## C. Les autres gènes candidats associés à la prolificité ovine

### 1) Gène *LEPR* – Davisdale

Les précédentes mutations décrites ont pour effet d'augmenter la prolificité à l'état hétérozygote cependant, une mutation dans le gène *LEPR*, codant pour le récepteur de la leptine, a été identifiée comme responsable d'une baisse de la prolificité, mais également d'une augmentation de l'âge à la première mise bas. Quatre béliers Davisdale dont les filles différaient par l'âge à la puberté ont été sélectionnés pour un séquençage complet de leur génome. Des SNPs ont été recherchés parmi les régions codantes des gènes connus dans la régulation de la fonction de reproduction (Haldar et al., 2014). Des polymorphismes ont été identifiés dans les gènes suivants : *LEPR*, *FSHR*, *LHCGR*, *BMP7*, *PGR*, *IGFIR* et *MNTNRIA*. Seul le statut homozygote aux trois SNPs dans le gène *LEPR* a été associé à un retard de puberté. Les homozygotes à ces mutations avaient également un nombre d'ovulations inférieur d'environ 15% ( $P < 0,001$ ) par rapport aux sauvages (Juengel et al., 2015). Quelques études physiologiques suggèrent effectivement que la leptine exogène stimule la folliculogénèse chez les ovins (Kendall et al., 2004; Muñoz-Gutiérrez et al., 2005).

### 2) Gène *FecW* – population Wishart

En 1995, une brebis avec une prolificité exceptionnelle a été identifiée dans le troupeau de mouton Romney de M. Wishart. Cette brebis a donné naissance à 21 agneaux en 7 portées, avec deux portées de quadruplets et quatre portées de triplets. Les mesures de nombre d'ovulations de 547 descendantes de 24 mâles, issus de cette lignée hyperprolifique de moutons Romney, montrent la ségrégation d'un gène majeur autosomal appelé *FecW* (Wishart).

Les différentes mutations déjà identifiées ont été testées et ne sont pas présentes. Une copie du locus muté augmente le nombre d'ovulations de 0,8 à 1,0. L'effet de deux copies du gène n'est pas encore établi (Davis, 2005).

### 3) Gène *FecX2<sup>W</sup>* – mutation Woodlands

La ségrégation d'un gène majeur de prolificité dans les lignées Woodlands et Metherell a été démontrée (Davis et al., 2001; Davis, 2005). Ces deux lignées ont été établies à partir de mêmes moutons fondateurs Coopworth dans les années 1960 et partagent donc un ancêtre commun. Cependant, elles ont été sélectionnées de manière indépendante sur 6 à 10 générations.

La mutation a été primo localisée sur le chromosome X et a été appelée *FecX2<sup>W</sup>*. Son effet a été estimé à +0,25 agneau par mise-bas par allèle. Elle a une ségrégation particulière liée au fait que



le gène majeur serait soumis à une empreinte épigénétique maternelle (Davis et al., 2001). Le gène *FecX2* est rendu silencieux si la fille a hérité de l'allèle muté *FecX2<sup>W</sup>* de sa mère ou bien de son père qui lui-même l'aurait hérité d'une mère qui exprimait activement ce gène. Pour que le phénotype s'exprime, il faut que l'allèle vienne du père mais que la grand-mère n'ait pas exprimé activement ce gène. Basé sur ce profil de ségrégation atypique, il semble fortement probable que le gène responsable dans les deux lignées (c'est-à-dire Woodlands et Metherell) soit le même. Cependant, le fait que ce soit le même gène ne signifie pas que les mutations soient également identiques et cette hypothèse reste à vérifier.

La ségrégation de la mutation Woodlands soumise à une transmission entre générations bien particulière rend son étude difficile. En effet, l'attribution d'un phénotype à un individu n'est pas seulement liée à la présence ou non de l'allèle muté, mais aussi à la manière dont il a reçu cet allèle de ses parents et de ses grands-parents. Une étude physiologique a essayé de caractériser le phénotype Woodlands (Feary et al., 2007). Le développement folliculaire est altéré chez les brebis qui expriment le gène. La formation de l'antrum dans le follicule arrive plus tôt et dans de nombreux cas les structures folliculaires sont atypiques. L'expression des gènes *BMP15*, *TGFBR1* et *BMPR1B* est altérée chez les brebis hétérozygotes, ce qui peut mener à une altération de la voie de signalisation de *BMP15* ou *GDF9*. Une des hypothèses est que ces différences d'expression doivent contribuer à l'augmentation du nombre d'ovulations observé chez les brebis hétérozygotes. Pour le moment, aucun cas de stérilité dans ces troupeaux n'a été mis en évidence.

*Suite à la mise en évidence des gènes Fec et de leurs mutations contrôlant le nombre d'ovulations et la prolificité des ovins, un certain nombre d'équipes a tenté d'établir une association entre des polymorphismes dans des gènes en lien avec la fonction de reproduction et ces phénotypes. Cependant, ces études ont porté soit sur des races sans données préalables permettant d'établir une hypothèse de ségrégation d'un gène majeur, soit en comparant des races différant par leur prolificité moyenne. Quoi qu'il en soit, dans aucun des cas ces études ont réellement prouvé la causalité fonctionnelle de ces polymorphismes dans le contrôle de la prolificité.*



#### 4) Les gènes de la famille BMPs

Comme les gènes *BMP15* et *GDF9*, les gènes *BMP2* et *BMP7* codent pour les ligands de la famille du TGF $\beta$ , ils sont donc des gènes candidats potentiels pour jouer un rôle dans la régulation de la proliféricité.

Trois SNPs identifiés dans les gènes *BMP2* (g.48462350C>T) et *BMP7* (g.58171856C>G ; g.58171886A>C) ont été testés en analyse d'association avec la taille de portée de brebis de la race Small Tail Han (n=348). Ces polymorphismes se sont révélés être corrélés à la taille de portée en fonction du rang de mise bas (Zhang et al., 2019). Cependant ces auteurs n'ont pas contrôlé la présence de *FecB<sup>B</sup>* en ségrégation dans cette population, BMPR1B étant pourtant un récepteur connu de ces deux ligands (Derynck and Feng, 1997). Toujours dans la race Han, un SNP g.5058476C>T situé dans un intron du gène *TGFBR2*, le récepteur de type 2 du TGF $\beta$ , est également associé à l'augmentation de la taille de portée quelle que soit la parité (Wang et al., 2018). Dans la seconde race chinoise Hu, un SNP dans la séquence 3' non traduite du transcrit du gène *INHBB* codant la sous-unité béta de l'inhibine B, montre également une association avec la proliféricité des brebis Hu (Chu et al., 2011b).

#### 5) Les gènes codant des récepteurs hormonaux

Dans le cadre du contrôle de la fonction de reproduction femelle, les gènes codant les récepteurs pour des hormones (stéroïdes, peptidiques ou neuro-peptidiques) agissant sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique constituent des candidats évidents. Ainsi, un polymorphisme de type SNP a été découvert dans le gène codant le récepteur alpha de l'œstradiol (*ESR1*) en association avec la proliféricité en race chinoise Hu (Bi et al., 2005). Dans cette même race, une autre étude a mis en évidence deux SNPs dans la région codante du gène *NR5A2* (Li et al., 2015), codant la protéine LRH1 (Liver Receptor Homolog-1), un récepteur nucléaire orphelin modulant la stéroïdogénèse et jouant un rôle clef lors de l'ovulation, l'expansion du cumulus et la lutéinisation (Meinsohn, 2019). Dans la seconde race chinoise très étudiée, la Small Tail Han, des polymorphismes associés à l'hyperproliféricité de cette race (en dehors de *FecB<sup>B</sup>*) ont été mis en évidence dans les gènes *FSHR* codant le récepteur de l'hormone gonadotrope FSH (Chu et al., 2012; Wang et al., 2015), *PRLR* codant le récepteur de la prolactine (Chu et al., 2007) et *GPR54* codant le récepteur du neuropeptide kisspeptin impliqué, entre autres, dans l'activation des neurones à GnRH lors de la puberté et au moment de l'ovulation (Chu et al., 2012). Indépendamment, un SNP g.3431C>A dans l'ADNc de *GPR54*, responsable d'un changement d'une phénylalanine en leucine en position 195 de la protéine, a été montré associé à une augmentation de la taille de portée et du



poids des agneaux à la naissance en race Iranienne Mehraban (Madj et al. 2019). Enfin, toujours en race chinoise Han, un polymorphisme dans le gène codant le récepteur à la mélatonine MTNR1A impliqué dans le contrôle de la photopériode vient récemment d'être associé à la taille de portée (He et al., 2019). En effet, l'allèle T du SNP g.15118756C >T dans l'exon 2 du gène *MTNR1A* est associé à une augmentation significative de la prolificité de +0,6 à +0,8 agneau par mise-bas en fonction de la parité des brebis, mais uniquement à l'état homozygote.

#### 6) Le gène *HIRA*

Dans le but d'identifier un nouveau gène majeur affectant la prolificité de races présentes en Chine mais sans a priori sur le candidat, les génomes complets de 89 moutons de neuf lieux géographiques du territoire chinois ainsi que 10 Mérinos d'Australie ont été séquencés (Zhou et al., 2018). Les races Small Tail Han Sheep, Hu et Cele black, connues pour leur moyenne de prolificité élevée, ont été comparées aux races Ujimquin, Bayinbuluke, Tan, Oula, Prairie Tibetan et Valley Tibetan ayant une prolificité bien plus modérée. Une recherche de trace de sélection a conduit les auteurs à étudier une région significative du chromosome 17 ne contenant qu'une seule annotation pour le gène *HIRA* (Histone Cell Cycle Regulator). La littérature indique que ce gène joue un rôle dans l'assemblage des nucléosomes et le développement précoce de l'embryon (Lin et al., 2014; Nashun et al., 2015). Un polymorphisme de type SNP dans ce gène (g.71833755T>C ou c.2546T>C) introduisant une substitution non conservative dans la protéine HIRA (Q849R) est plus particulièrement associé à la taille de portée moyenne des trois premières mises bas pour les brebis de la race Small Tail Han (Zhou et al., 2018).

### D. Déterminisme génétique de la prolificité dans d'autres espèces

La productivité numérique et donc la prolificité sont des caractères qui peuvent intéresser la sélection génétique d'autres espèces de rente comme les caprins et les porcins. En revanche, ce caractère est plutôt considéré comme indésirable chez les bovins. En effet, la présence simultanée d'un embryon mâle et d'un embryon femelle conduit au phénomène de « free martinisme » qui se traduit par une masculinisation de la femelle (échanges fœtaux d'AMH et d'androgènes) qui ne pourra pas devenir une génisse productive. Dans l'espèce humaine, en dehors de toute considération de sélection génétique bien évidemment, la naissance de jumeaux dizygotiques est en lien directe avec un nombre d'ovulations plus élevé possiblement sous déterminisme génétique.

Tableau 3: Localisation chromosomique des QTLs et SNPs associés aux taux de gémellité et au nombre d'ovulations chez les bovins.

Trait	Chromosome and approximate location within chromosome (Mb)	Population	Positional candidate genes (chromosome)	Ref.
Ovulation rate	7 (40) and 23 (27)	MARC twinner	CYP21 (23)	Blattman <i>et al.</i> , 1996
Twinning rate	5 (64), 7 (108), 12 (10) and 23 (26)	Norwegian cattle	IGF1 (5), CYP21 (23)	Lien <i>et al.</i> , 2000; Meuwissen <i>et al.</i> , 2002
Ovulation rate	5 (46)	MARC twinner		Kappes <i>et al.</i> , 2000; Allan <i>et al.</i> , 2009
Twinning rate	5 (68)	US Holstein	IGF1 (5)	Cruickshank <i>et al.</i> , 2004; Kim <i>et al.</i> , 2009b
Twinning rate	8 (108), 10 (26) and 14 (51)	US Holstein		Cobanoglu <i>et al.</i> , 2005
Ovulation rate	14 (61)	MARC twinner		Gonda <i>et al.</i> , 2004
Ovulation rate	7 (22), 10 (75) and 19 (42)	MARC twinner	AMH (7), ESR2 (10), IGFBP4(19)	Arias and Kirkpatrick, 2004
Twinning rate	4 (44), 5 (67), 6 (8, 44), 7 (68, 76), 8 (58), 9 (34), 11 (47), 14 (21, 38), 15 (23), 23 (51), and 28 (9)	US Holstein	IGF1 (5)	Kim <i>et al.</i> , 2009a; Bierman <i>et al.</i> , 2010
Twinning rate	6 (51), 7 (19), 23 (27)		AMH (7), CYP21 (23)	Weller <i>et al.</i> , 2008
Twinning rate	24 (40)	Italian Maremmana		Moioli <i>et al.</i> , 2017

(Garcia-Guerra et al. 2018)



## 1) Les espèces monotoques caprines et bovines

Pour la chèvre, seule la France dispose d'un schéma de sélection organisé, mais il n'existe pas de programme génétique sur la sélection de la prolificité car la production est quasi exclusivement laitière. Par contre, la prolificité intéresse d'autres pays consommateurs de viande caprine. La recherche de polymorphismes associés à la prolificité chez la chèvre est exclusivement basée sur une approche « gène candidat » sur la base des connaissances acquises en ovins.

Le résultat le plus surprenant est la découverte de l'allèle ovine *FecB<sup>B</sup>* de *BMP1B* en ségrégation dans la race caprine Black Bengal en Inde (Polley et al., 2009). L'effet de la mutation *FecB<sup>B</sup>* a été estimé à + 0,3 chevreau par portée. La ségrégation d'une même mutation dans deux espèces différentes amène à se questionner sur l'origine de la mutation (antérieure à la séparation des genres *capra* et *ovis*) ou à des croisements entre caprin et ovine, donnant des hybrides (chabin ou ovicapre) fertiles dans de rares cas (Cribo et al., 1988).

De nombreux SNPs dans le gène *GDF9* caprin (mais différents de ceux identifiés chez les ovins) sont rapportés avec des effets significatifs sur la taille de portée pour des races très prolifiques comme la Jining Grey en Chine (Chu et al., 2011a; Feng et al., 2011), ou la Black Bengal (Ahlawat et al., 2013). Il en est de même avec des SNPs dans *BMP15* pour la race Jining Grey (Feng et al., 2009, 2014). D'autres polymorphismes associés à la prolificité chez la chèvre sont également décrits dans d'autres gènes candidats impliqués dans la fonction de reproduction, tels que : *INHA* (He et al., 2010), *GH* (Zhang et al., 2011), *KISS1* (An et al., 2013), *KITLG* (An et al., 2015) et *IGF1* (Thomas et al., 2016).

Bien que contre-sélectionnée, la variation du nombre d'ovulations et de la prolificité existe aussi chez les bovins, les taux de naissances gémellaires atteignant 4 à 5 % en race Holstein et Maine-Anjou/Rouge-des-Près (Vinet et al., 2012). Il a été suggéré que ce taux de jumeaux pouvait être sous le contrôle d'un gène majeur (Morris and Day, 1990). Un certain nombre d'équipes a tenté de rechercher des mutations associées à la gémellité chez la vache (Tableau 3). Une première série d'études avait identifié un QTL sur le chromosome 5 bovin et le gène *IGF1* comme meilleur candidat positionnel (un SNP associé au phénotype, (Kim et al., 2009)) et fonctionnel (taux sérique d'IGF1 plus élevé dans les familles sélectionnées sur la gémellité, (Echternkamp et al., 1990)). Une seconde série d'études a été menée par une autre équipe à partir de l'observation d'une vache très prolifique qui avait eu 3 séries de triplés. Ils ont généré et phénotypé pour le nombre d'ovulations une famille de petites-filles à partir d'un fils de cette vache extrême. Les travaux de localisation du déterminisme génétique du nombre d'ovulations pour cette famille ont permis de localiser l'allèle prolifique

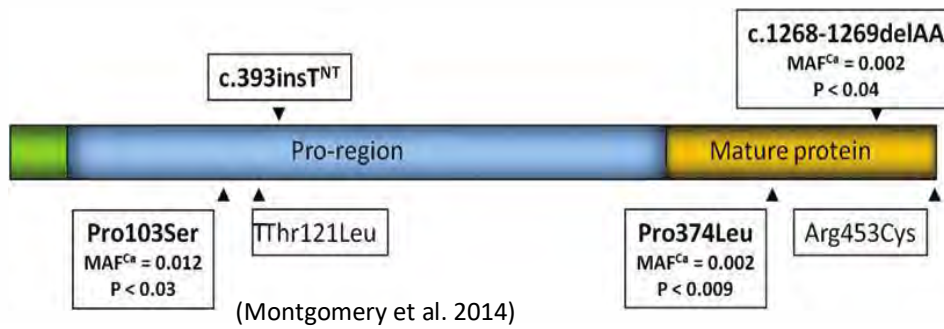


Figure 13: Substitutions et Insertions/délétions dans la protéine GDF9 humaine associées à une augmentation de la fréquence de gémellité dizygotique.

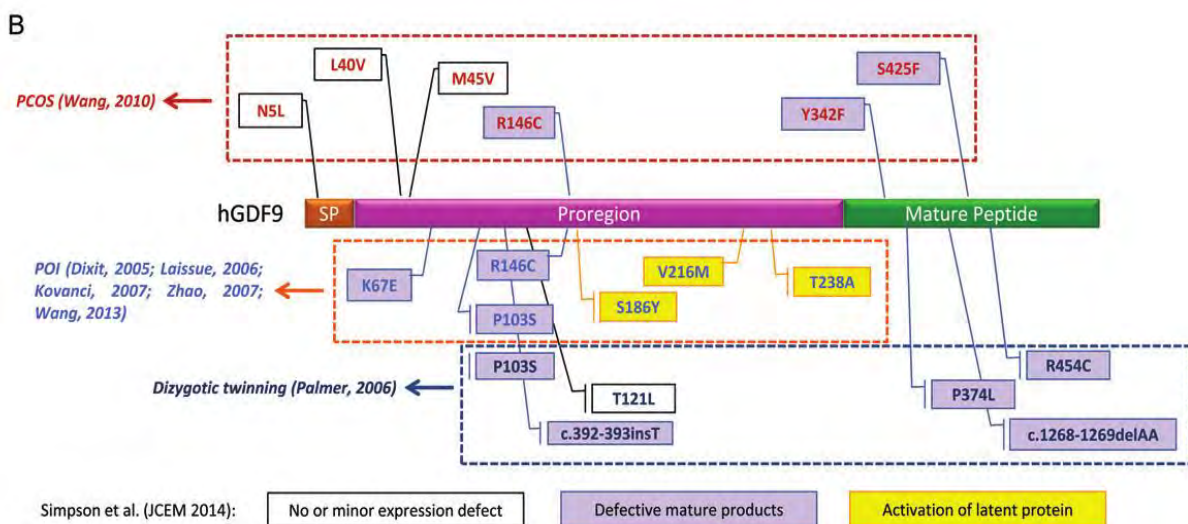
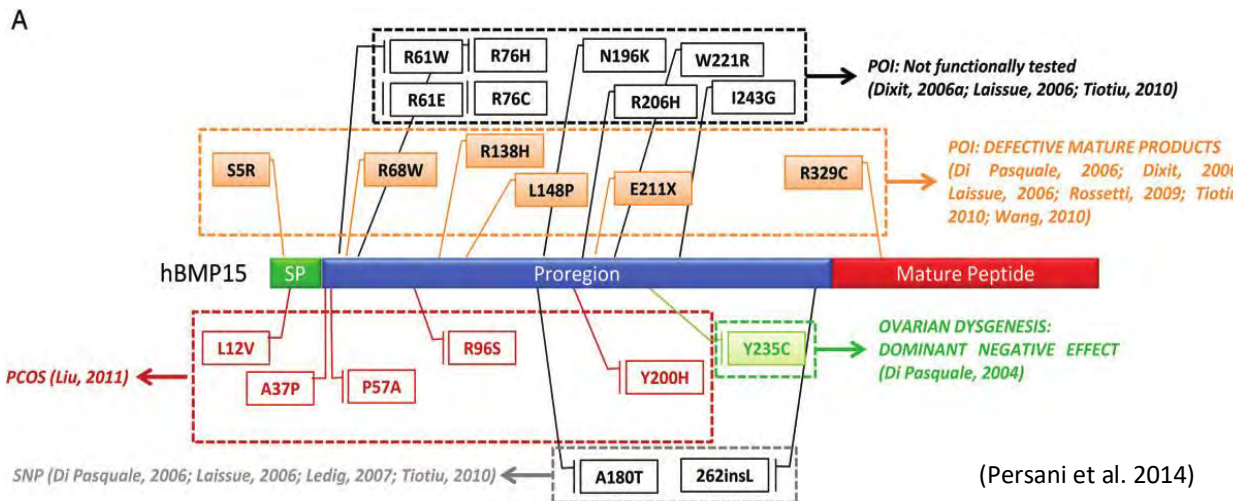


Figure 14: Substitutions, et Insertions/délétions dans les protéines BMP15 et GDF9 humaine associées aux syndromes ovariens chez la femme.

Illustration schématique des variants humains BMP15 (A) et GDF9 (B) identifiés en association avec dysgénésie ovarienne, ou une insuffisance ovarienne précoce (POI) ou un syndrome des ovaires polykystiques (PCOS). L'impact fonctionnel prévu par le type de variation ou les études *in vitro* est également rapporté.

nommé Trio dans une région de 1.2 Mb sur le chromosome 10 bovin comprenant les gènes candidats *SMAD3*, *SMAD6* et *IQCH* (Kirkpatrick and Morris, 2015). Bien qu'aucun polymorphisme causal n'ait été détecté dans *SMAD6*, les études fonctionnelles de transcriptome et de protéome qui ont suivi semblent désigner ce gène de la signalisation des BMP comme le meilleur candidat (Kamalludin et al., 2018).

Finalement, chez la vache, très peu d'études ont tenté une approche gènes candidats pour *BMP15* et *GDF9* en lien avec la gémellité. Seule l'observation d'une délétion de 4pb dans la séquence codante de *BMP15* causant l'apparition d'un codon stop prématuré en position 264 de la protéine a été rapportée à l'état hétérozygote dans 5 races chinoises (Zhang et al., 2009). Cependant, aucune des vaches porteuses de ce polymorphisme ne montre une augmentation de la prolificité.

## 2) L'espèce humaine

Les naissances gémellaires dans l'espèce humaine sont relativement fréquentes (13 sur 1000 grossesses), mais ce taux change en fonction des années et des pays (15-16/1000 aux USA et en Europe, contre 9/1000 en Asie, Hoekstra et al., 2008). Il y a deux types de naissances gémellaires, monozygotiques (scission d'un même embryon) ou dizygotiques (ovulation multiple et fécondation indépendante de chaque ovocyte) comme observées chez la brebis. Différents facteurs « environnementaux » peuvent influencer sur la gémellité dizygotique dans l'espèce humaine, comme l'âge à la conception, la composition corporelle ou encore la consommation de tabac, mais des facteurs génétiques sont également impliqués. Un certain nombre de travaux a tenté d'associer des polymorphismes dans les gènes *FSHR* (Al-Hendy et al., 2000), *INHA* ou *INHBB* (Montgomery et al., 2000) mais sans résultat convaincant. Les données les plus probantes concernent des polymorphismes dans le gène *GDF9* associés à un risque accru de gémellité dizygotique, mais n'expliquant que 2% de la variance génétique (Figure 13, Hoekstra et al., 2008; Montgomery et al., 2004, 2014; Palmer et al., 2006).

Il est intéressant de noter que les mères de jumeaux dizygotiques semblent atteindre la ménopause plus précocement que les mères de jumeaux monozygotiques (Gosden et al., 2007; Martin and Park, 1999). On pourrait rapprocher cela à l'observation chez la femme de nombreuses mutations dans le gène *GDF9*, mais aussi *BMP15*, associées à des syndromes ovariens, comme l'insuffisance ovarienne prématurée ou les ovaires polykystiques (Figure 14, pour revue Persani et al., 2014). Ainsi, la question se pose de l'interaction entre le déterminisme génétique de la gémellité et celui de ces syndromes via un mécanisme commun de contrôle de la fonction ovarienne, même si les variants découverts dans *GDF9* ne sont pas les mêmes (Figure 13 et Figure 14).



### 3) Les espèces polytoques murines et porcines

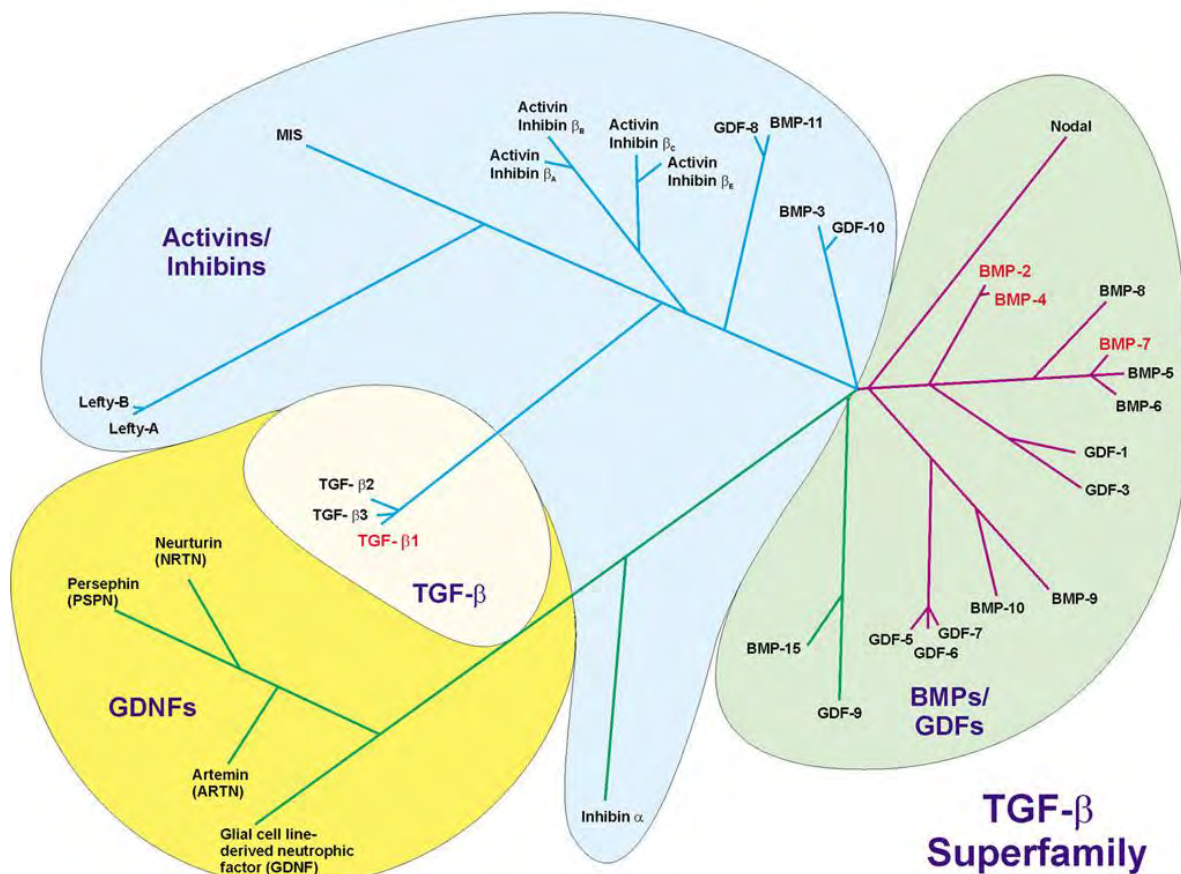
Chez la truie ou la souris, qui sont poly-ovulantes par nature, contrairement aux ruminants ou la femme qui font partie d'espèces dites mono-ovulantes ou monotoques, il n'y a pas d'hypothèse de ségrégation de gènes majeurs contrôlant ce phénotype. Cependant, une variabilité du nombre d'ovulations et de la prolificité peut être observée que ce soit chez la truie ou la souris. Ainsi différentes études de détection de QTL pour ce caractère de prolificité ont été entreprises, mais aucune mutation causale n'a pu être identifiée (souris : (Kirkpatrick et al., 1998; Suto, 2015)); truie : (Rempel et al., 2010; Wu et al., 2018)). L'hypothèse avancée face à la difficulté de trouver des signaux QTL forts (en porc en particulier avec l'utilisation de croisement entre races de prolificités différentes) serait en lien avec le phénomène d'épistasie dans lequel l'effet phénotypique des allèles prolifiques serait fortement modulé par le fond génétique dans lesquels ils ségrégent (Noguera et al., 2009).

En parallèle de ces études, les recherches spécifiques de variants prolifiques dans les gènes *BMP15* (Wang et al., 2003), *GDF9* (Zhang et al., 2008) et *BMPR1B* porcins (Tomás et al., 2006) ont toutes échoué. La génération d'une lignée de porc avec une modification ciblée réalisée par l'approche CRISPR/CAS9 pour recréer la mutation Booroola *BMPR1B*<sup>Q249R</sup> n'a pas non plus permis de faire un lien avec une variation de la prolificité (Zhao et al., 2016).

Chez la souris, des animaux invalidés pour *gdf9* (Dong et al., 1996), *bmp15* (Yan et al., 2001), et *bmpr1b* (Yi et al., 2001) ont été générés. Aucune invalidation de ces trois gènes n'a d'effet à l'état hétérozygote sur la prolificité ou la fertilité des souris. Par contre, à l'état homozygote les souris *gdf9*<sup>-/-</sup> sont infertiles avec un blocage précoce de la folliculogénèse au stade primaire avec des follicules ovariens ne possédant qu'une seule couche de cellules de la granulosa (Dong et al., 1996). Ce phénotype est identique à celui des brebis homozygotes pour les mutations dans *BMP15* chez les ovins : Inverdale (*FecX<sup>l</sup>*) et Hanna (*FecX<sup>H</sup>*, Galloway et al. 2000), Lacaune (*FecX<sup>l</sup>*, (Bodin et al., 2007)) ou Barbarine (*FecX<sup>Bar</sup>*, Lassoued et al., 2017). Cependant, les souris *bmp15*<sup>-/-</sup> ne montrent qu'une fertilité diminuée avec un nombre d'ovulations et un taux de fécondation réduits (Yan et al., 2001). Les souris *bmpr1b*<sup>-/-</sup> sont infertiles, mais contrairement aux souris *gdf9*<sup>-/-</sup>, la folliculogénèse est complète, l'infertilité étant expliquée par un défaut d'expansion du cumulus empêchant la fécondation *in vivo*. Par contre les ovocytes de ces souris sont fécondables *in vitro* (Yi et al., 2001).



L'ensemble de ces observations laisse à penser que la recherche de mutations à effet majeur de la prolificité chez les ovins a permis de mettre en évidence des gènes clefs du contrôle de la fonction ovarienne chez les mammifères avec en particulier le rôle crucial du système de signalisation des BMPs. Cependant la caractéristique spécifique de contrôle du nombre d'ovulations et de la prolificité par ces gènes semble dépendante de l'espèce et de son statut mono ou poly-ovulant.



(Weiskirchen et al. 2009)

Figure 15: Arbre phylogénétique des ligands de la super famille du TGF- $\beta$ .

Sur la base de leurs caractéristiques structurales, les 35 membres de la famille TGF-béta sont subdivisés en (i) TGF-béta, (ii) activines / inhibines, (iii) bone morphogenetic proteins (BMP) / differentiation factors (GDF), et (iv) le groupe plus étroitement lié de ligands du GDNF. L'affiliation à l'un de ces sous-groupes est ambiguë et traitée de manière quelque peu irrégulière. TGF-beta1, BMP-7, BMP-2 et BMP-4 (toutes marquées en rouge) sont les cytokines qui ont une importance exceptionnelle dans le contrôle de la fibrogenèse.

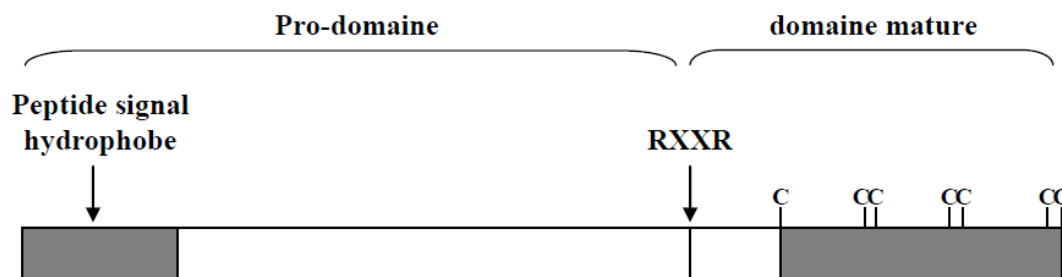


Figure 16: Représentation schématique de la structure protéique primaire des BMPs.

Elles sont sécrétées sous forme de précurseur contenant un peptide signal hydrophobe ainsi qu'un site de coupure RXXR permettant la libération du domaine mature après clivage par une endoprotéase.



## II. Conséquences des mutations des gènes majeurs « *Fec* » sur la physiologie ovarienne

On connaît actuellement quatre gènes *Fec* (*FecB/BMPR1B*, *FecX/BMP15*, *FecG/GDF9* et *FecL/B4GALNT2*) dont les mutations affectent la prolificité des ovins via un contrôle du nombre d'ovulations. Ces mutations entraînent toutes un phénotype d'hyperprolificité à l'état hétérozygote et, pour certaines d'entre elles, une stérilité à l'état homozygote, donnant un premier aperçu du rôle crucial des gènes *Fec* dans la fonction de reproduction femelle. Parmi ces quatre gènes, trois sont des membres du système de signalisation cellulaire des Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), deux ligands, BMP15 et GDF9, et le récepteur BMPR1B.

Avant de présenter comment l'identification des gènes *Fec* et leurs mutations associées ont permis d'approfondir nos connaissances sur la physiologie de la fonction ovarienne, je souhaite vous introduire quelques notions sur le système de signalisation des BMPs, ainsi que sur la folliculogénèse et la physiologie ovarienne chez la brebis.

### A. Le système de signalisation cellulaire des BMPs

#### 1) Les ligands et récepteurs

Les BMPs font partie de la superfamille du Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), il s'agit de la plus grande famille de protéines de sécrétion chez les mammifères (Peng et al., 2013a). Parmi la trentaine de protéines que constitue cette famille, on retrouve quatre sous-groupes phylogénétiques : les TGF $\beta$ , les GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor), les Activine/Inhibine (dont l'hormone Anti-Müllerienne, AMH) et les GDFs (Growth and Differentiation Factor) / BMPs (dont *BMP15* et *GDF9*, Figure 15 ; Weiskirchen et al., 2009). Il s'agit des cytokines impliquées dans la régulation de la croissance, la différenciation et l'apoptose de différents types cellulaires, dont les cellules ovariennes (Elvin et al., 1999; Monniaux et al., 2019; Shimasaki et al., 1999). Les BMPs sont synthétisées sous la forme de précurseurs contenant un peptide signal hydrophobe, un pro-domaine de taille variable contenant des sites potentiels de N-glycosylation et un domaine C-terminal (Galloway et al., 2000; McIntosh et al., 2012). Le clivage de ces précurseurs par des protéines convertases au niveau d'un motif RXXR, permet la libération du domaine C-terminal, le domaine mature qui porte l'activité biologique, du pro-domaine N-terminal (Figure 16).

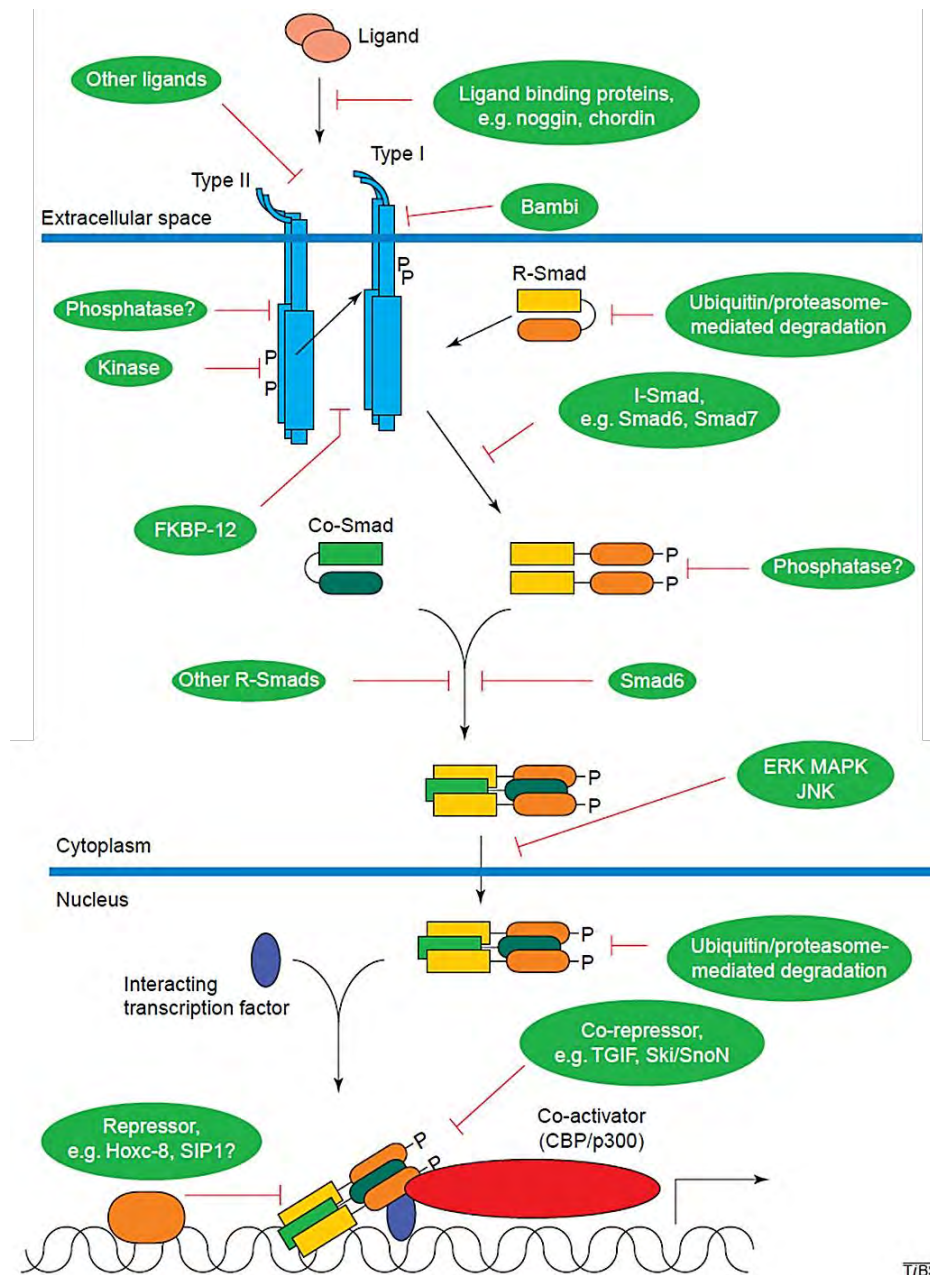


Figure 17: Voie de signalisation des BMPs et ses régulations.

(Ten Dijke et al., 2000) Les flèches en noir représentent la voie de signalisation. La liaison du ligand BMP dimérique va entraîner la formation d'un complexe hétérotétramérique de deux récepteurs de type I et de deux récepteurs de type II. Ce rapprochement moléculaire permet la phosphorylation du récepteur de type I par l'activité kinase constitutive du récepteur de type II. Cette activation entraîne la phosphorylation des R-SMADs, (dissociation des domaines MH-1 et MH-2) et une hétéro-oligomérisation avec SMAD4 (Co-SMAD). Les complexes R-SMAD/SMAD4 sont transloqués dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles, soit en se liant directement à l'ADN, soit en coopérant avec d'autres facteurs de transcription. Les inhibitions de cette voie sont notées avec des traits rouges et les molécules inhibitrices sont représentées par les bulles vertes.

Le rôle du pro-domaine est encore mal défini, néanmoins il semble être impliqué dans la stabilité et la spécificité de la pro-protéine, et s'avère être nécessaire à la formation du dimère, voire d'hétérodimères (Gray and Mason, 1990; McIntosh et al., 2008; Sengle et al., 2011). Le domaine mature des membres de la super famille du TGF $\beta$  présente une structure particulière dite en « nœud de cystéine ». Six des sept cystéines présentes dans le domaine mature forment des ponts disulfures deux à deux. La septième cystéine, située en amont de la cystéine 4 est impliquée dans la formation du dimère. Cependant, toutes les protéines de la famille ne possèdent pas cette cystéine impliquée dans la dimérisation (Vitt et al., 2001). BMP15 et GDF9 pour lesquels cette cystéine est remplacée par une sérine, ne peuvent donc pas créer des dimères liés de façon covalente, ce qui suggère un autre type de liaison pour la dimérisation de ces molécules, probablement des interactions labiles de type électrostatiques et hydrophobes (McIntosh et al., 2008). Les membres de la famille du TGF $\beta$  peuvent également former des hétérodimères entre eux.

C'est notamment le cas de la sous-famille inhibine/activine dont l'homodimérisation de deux sous-unités  $\beta$ ,  $\beta$ A ou  $\beta$ B, est à l'origine de la formation de l'activine A et de l'activine B respectivement, alors que l'hétérodimérisation d'une sous-unité  $\alpha$  avec l'une des deux sous-unités  $\beta$  forme l'inhibine A ou l'inhibine B (Knight et al., 2012). Dans la sous-famille des BMPs, BMP15 et GDF9 sont également capables de former un complexe hétéromérique (Liao et al., 2003; Mottershead et al., 2015). Cet hétérodimère BMP15/GDF9, maintenant nommé Cumuline, présente une activité supérieure à chaque homodimère BMP15 ou GDF9 sur la prolifération des cellules ovariennes de la granulosa ou l'expansion du cumulus (Mottershead et al., 2015; Peng et al., 2013a). C'est également l'observation faite pour les hétérodimères BMP2/BMP7 ou BMP2/BMP6 qui ont une activité 5 à 10 fois supérieure à celle de l'homodimère BMP2/BMP2 sur la formation de cartilage et d'os (Israel et al., 1996; Valera et al., 2010).

Pour médier leurs actions cellulaires, les cytokines de la famille BMP se lient suivant leur affinité à un complexe tétramérique de deux types de récepteurs membranaires (type I et type II) possédant chacun une activité sérine/thréonine kinase (Figure 17; ten Dijke et al., 2000). Les deux types de récepteurs sont composés d'un domaine N-terminal extracellulaire de liaison au ligand, d'un seul passage transmembranaire et d'une partie cytoplasmique possédant l'activité kinase. Le récepteur de type II impliqué dans la signalisation des BMP est BMPRII. Néanmoins les récepteurs de l'activine, ActRII et ActRIIB peuvent participer à la signalisation des BMPs, mais avec une affinité pour les BMPs plus faible que pour l'activine. L'activité sérine/thréonine kinase des récepteurs de type II est constitutive, indépendante de la liaison du ligand, avec le récepteur de type I pour substrat (Massagué, 1998).

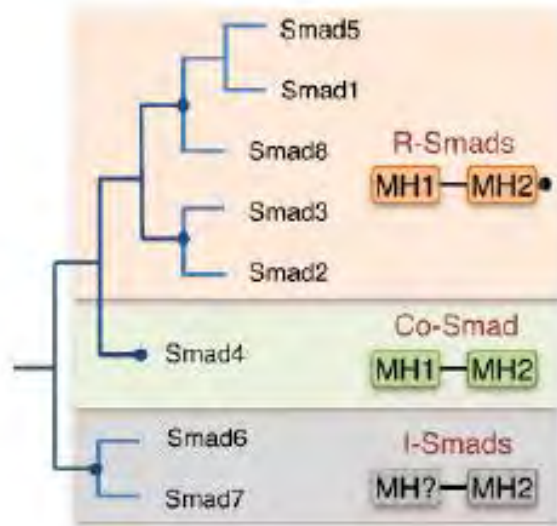


Figure 18 : Arbre phylogénétique des gènes codants les protéines SMADs.

(Macias et al. 2015) Les SMADs sont groupées en fonction de leur activité, les R-SMADs (Receptor-regulated SMADs), la Co-SMAD (Common SMAD) et les I-SMADs (Inhibitory SMADs). MH1 désigne le domaine de liaison à l'ADN, et MH2 le domaine de liaison aux récepteurs de type I, aux autres SMADs ou à d'autres facteurs transcriptionnels.

Trois récepteurs de type I sont également impliqués dans la voie de signalisation des BMPs: BMPR1A, BMPR1B et ACVR1. Seuls BMPR1A et BMPR1B sont spécifiques de la signalisation BMPs alors que le récepteur ACVR1 participe aussi à la signalisation de l'activine. En comparaison des récepteurs de type II, la partie cytoplasmique des récepteurs de type I possède en plus un domaine juxta-membranaire riche en glycine et sérine (domaine GS), qui est le site de phosphorylation par l'activité kinase des récepteurs de type II. Le domaine kinase des récepteurs de type I possède une partie spécifique de liaison aux protéines SMADs (Similar to Mothers Against Decapentaplegic) qui sont les principaux effecteurs intracellulaires de la voie de signalisation (Feng and Derynck, 1997; Persson et al., 1998) (Figure 17 et Figure 18).

Enfin, il existe également un co-récepteur pour les BMPs, l'inhibine et les TGF $\beta$ s, il s'agit d'un protéoglycan de surface, le bétaglycan ou récepteur de type III, TGFBR3, qui ne possède pas d'activité propre de signalisation. TGFBR3 peut se complexer avec les récepteurs de type I des BMPs pour optimiser leur activité (Lee et al., 2009). À l'inverse, en liant directement l'inhibine, TGFBR3 conduit à la formation d'un complexe stable et de grande affinité avec les récepteurs de type II de l'activine et des BMPs. La séquestration des récepteurs de type II empêche ainsi les interactions avec ces ligands, le recrutement de leurs récepteurs de type I et par conséquent la transduction de leurs signaux (Lewis et al., 2000; Wiater and Vale, 2003).

## 2) Les facteurs SMADs, effecteurs intracellulaires

Comme indiqué plus tôt, les BMPs ont la capacité d'activer des voies de signalisation dépendantes des molécules effectrices SMADs et de réguler la transcription de gènes cible impliqués dans la survie, l'apoptose, la migration et la différenciation cellulaire. Les SMADs sont classées en trois groupes : les R-SMADs (Receptor-regulated SMADs), la Co-SMAD (Common SMAD) et les I-SMADs (Inhibitory SMADs), formant une famille multigénique (Figure 18, Macias et al., 2015). Les R-SMADs sont phosphorylées et activées par les récepteurs de type I suite à la liaison des ligands. On distingue deux sous-groupes de R-SMADs, les SMADs 1, 5, 8 phosphorylées par les récepteurs I de type BMP (BMPR1A, BMPR1B et ACVR1) et les SMADs 2, 3 phosphorylées par les récepteurs I de type Activine/TGF $\beta$  (TGFBR1, ACVR1B, ACVRL1). Une fois activées, les R-SMADs dimériques forment des complexes hétéromériques avec la Co-SMAD ou SMAD4 commune aux deux voies (BMP et Activine/TGF $\beta$ ). Le troisième groupe est celui des SMADs inhibitrices, les I-SMADs qui vont inhiber le signal par compétition avec les R-SMADs (Figure 18). Les hétérocomplexes R-SMADs/SMAD4 formés sont ensuite transloqués dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles, soit en se liant directement à l'ADN, soit en coopérant avec d'autres facteurs de transcription.



### 3) Régulation de la voie de signalisation

La voie de signalisation des BMPs peut-être régulée à tous les niveaux, des ligands aux effecteurs intracellulaires (Figure 17). Ainsi, au niveau extracellulaire, la voie de signalisation est finement régulée de manière complexe, soit par l'association non-covalente des pro-domaines clivés aux domaines matures (forme dite « latente »), soit par des protéines antagonistes liant les BMPs (Noggin, Chordin ou Follistatine), ou encore par la compétition avec d'autres ligands (Inhibine). L'ensemble de ces mécanismes concourent tous à empêcher les BMPs de se fixer et de stimuler leurs récepteurs spécifiques (Blázquez-Medela et al., 2019; Bragdon et al., 2011; Glister et al., 2004; Izumi et al., 2006; Sabo, 2011).

Au niveau membranaire, le pseudo-récepteur BAMBI (BMP and Activin membrane bound inhibitor), dont l'expression est induite par les BMPs, se lie aux récepteurs BMPRI1A et BMPRI1B, interférant avec la formation des complexes avec les récepteurs de type II (Onichtchouk et al. 1999, Boergermann et al. 2010).

Au niveau sous-membranaire, l'immunophiline FKBP-12 a été décrite comme étant un inhibiteur commun aux récepteurs de type I. En se liant au domaine GS du récepteur de type I, elle masque les sites de phosphorylation par le récepteur de type II (Wang et al., 1996).

Au niveau intracellulaire, les BMPs induisent l'expression de leurs propres inhibiteurs (I-SMADs) tels que SMAD6 et SMAD7 qui disposent de nombreuses capacités pour désactiver et moduler la cascade de signalisation, soit en se fixant aux récepteurs soit en formant des complexes inactifs avec les R-SMADs (Heldin et al., 1997; Miyazono et al., 2005). Il existe également la voie de l'ubiquitinylation des SMADs qui sont alors dirigées au protéasome pour être dégradées.

La voie de signalisation BMP peut être en interaction fonctionnelle avec bien d'autres voies de signalisation pouvant moduler son action intracellulaire (IGF1, EGF, FSH par exemple), mais que nous ne détaillerons pas dans cette introduction. Ces autres voies utilisant l'intermédiaire de cascades de phosphorylation via ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), Map kinase p38 ou encore JNK (C-Jun N-terminal kinase) peuvent interférer en phosphorylant de façon atypique les R-SMADS (Figure 17).

## B. Folliculogénèse et physiologie ovarienne chez la brebis

Chez les mammifères, l'ovaire renferme un stock d'ovocytes formés dès la naissance. Cette réserve ovarienne de follicules primordiaux, que l'on estime entre 100 000 et 200 000 chez la brebis, va s'épuiser au cours du temps, sous l'action de deux processus, l'un étant la folliculogénèse

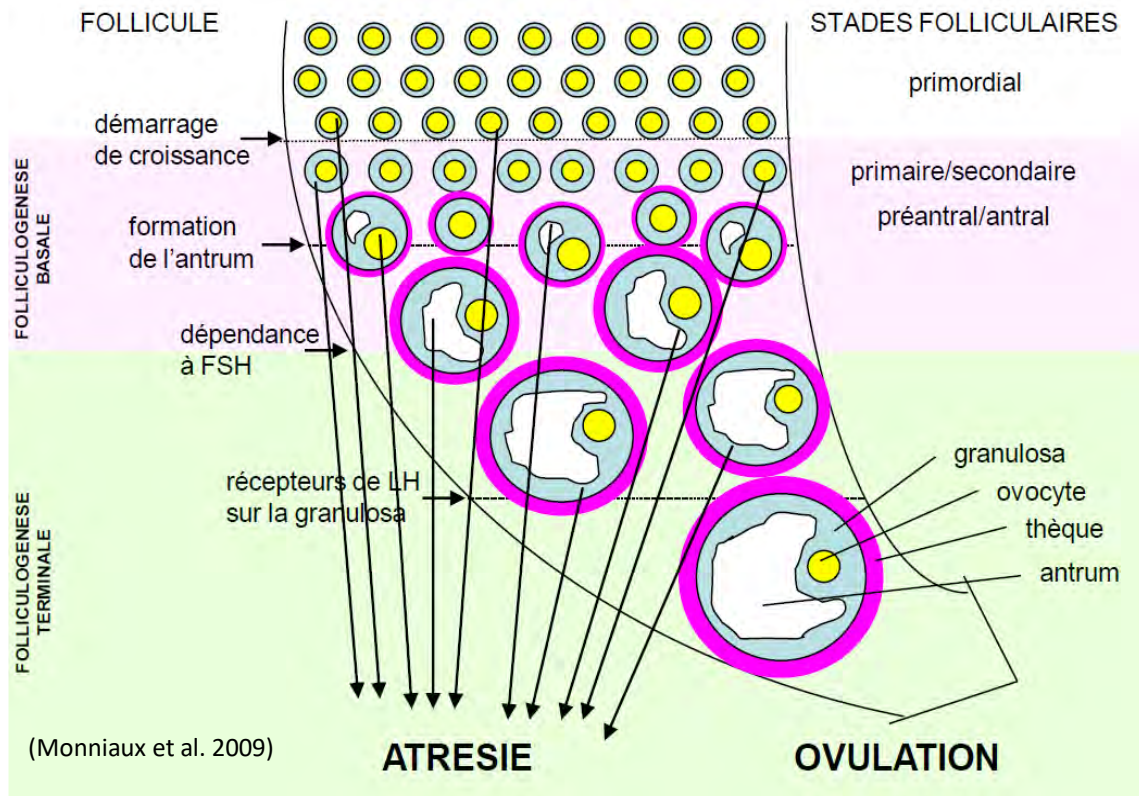


Figure 19: Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire.

La partie supérieure montre la moyenne (ligne noire) et l'étendue (ombrage) de la croissance du follicule et de l'ovocyte, du stade primordial jusqu'à l'ovulation. La partie inférieure montre l'émergence progressive de plusieurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques critiques au cours du développement des follicules. Les stades de développement ont été définis par deux systèmes différents : l'un basé sur la morphologie et l'autre sur les caractéristiques fonctionnelles des follicules.



aboutissant à l'ovulation et l'autre l'atrésie folliculaire. Chez les mammifères d'élevage, on ne constate pas d'épuisement complet de cette réserve. Seule la femme connaîtra l'épuisement de cette réserve en lien avec la ménopause.

### 1) La folliculogénèse et la cyclicité

La folliculogénèse est un ensemble de processus de croissance et de maturation des follicules ovariens du stade de follicule primordial jusqu'à l'ovulation. Ce processus commence chez le fœtus (cas de la brebis) ou peu après la naissance en fonction des espèces, et perdure tout au long de la vie. Selon que les espèces soient mono- ou poly-ovulantes, et à partir de la puberté, la folliculogénèse aboutit à la production d'un ou plusieurs ovocytes aptes à la fécondation et au développement à chaque cycle sexuel. La folliculogénèse peut se subdiviser en deux grandes étapes successives (Figure 19): la croissance folliculaire basale et la croissance folliculaire terminale.

#### a) Croissance folliculaire basale

La folliculogénèse basale, qui suit le recrutement initial, est une étape de croissance lente et continue des follicules, essentiellement contrôlée par des facteurs ovariens agissant en mode paracrine. Elle dure environ 6 mois chez la brebis. C'est au cours de cette phase que s'effectue l'essentiel de la croissance de l'ovocyte et qu'il acquiert la capacité à reprendre la division méiotique.

Au niveau morphologique, lors du démarrage du développement folliculaire, les cellules somatiques entourant l'ovocyte deviennent cubiques et forment le follicule primaire. Le diamètre du follicule va dès lors augmenter par prolifération des cellules somatiques constituant la granulosa, pour donner lieu au follicule secondaire (deux couches) et tertiaire (multicouches) (Figure 20). Le passage au follicule tertiaire ou pré-antral se caractérise par la formation d'une thèque interne (cellules fibroblastiques) dans laquelle se développe une vascularisation. Pour toutes les espèces de mammifères, à une taille d'environ de 200µm de diamètre, le follicule acquiert une thèque externe et une cavité, l'antrum qui se forme à l'intérieur de la granulosa. On parle alors de follicule antral. L'antrum contient le liquide folliculaire issu d'une accumulation de produits de sécrétion du follicule (protéines et stéroïdes) et d'éléments plasmatiques apportés par la circulation périphérique (Figure 20). La prolifération rapide des cellules de granulosa et l'accroissement du volume de l'antrum se poursuivent alors, augmentant considérablement le diamètre du follicule antral pour atteindre une taille de 2 à 3 mm chez la brebis.

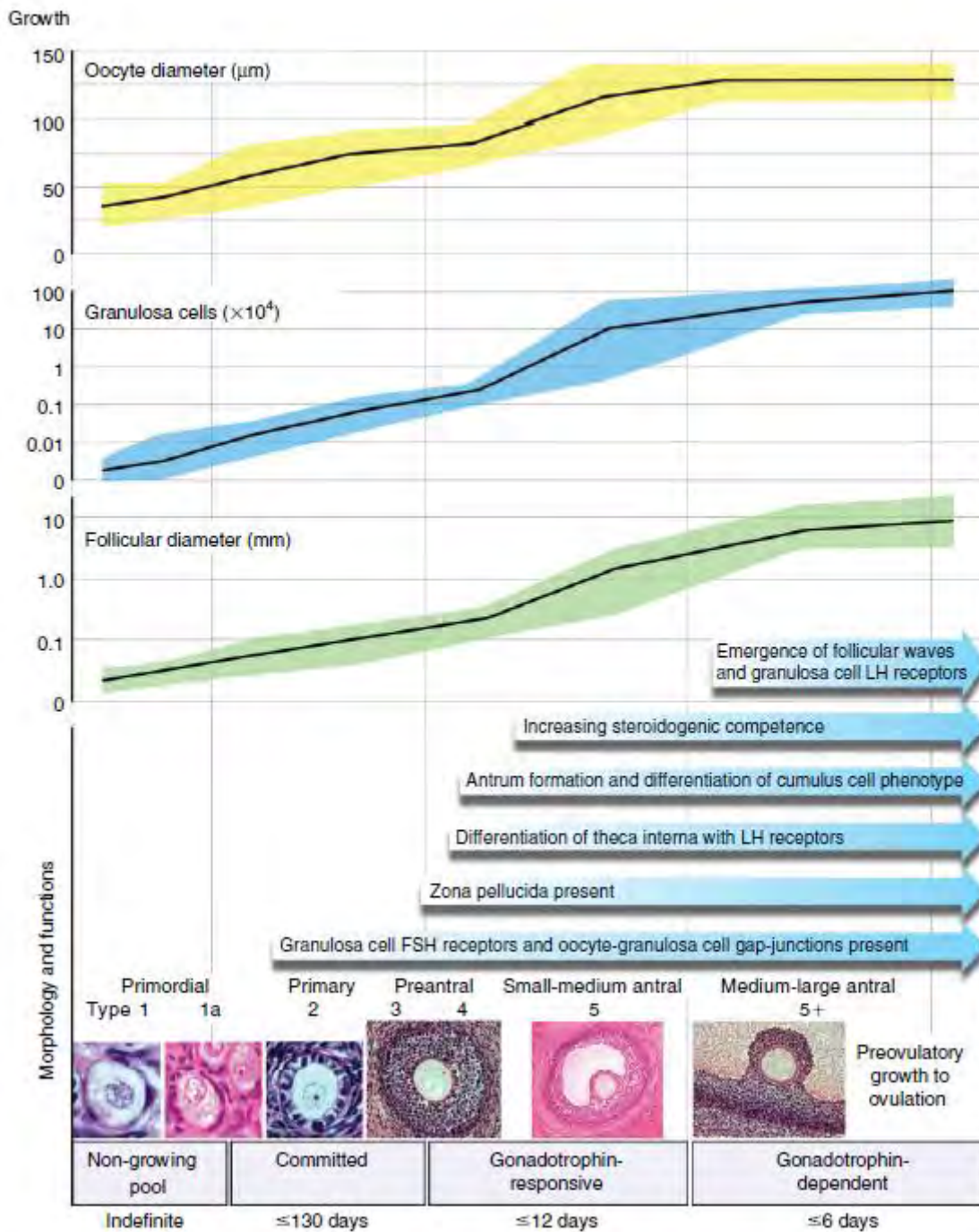


Figure 20: Folliculogenèse chez la brebis.

(Scaramuzzi et al. 2011) La partie supérieure montre la moyenne (ligne noire) et l'étendue (ombrage) de la croissance du follicule et de l'ovocyte, du stade primordial jusqu'à l'ovulation. La partie inférieure montre l'émergence progressive de plusieurs caractéristiques fonctionnelles et morphologiques critiques au cours du développement des follicules. Les stades de développement ont été définis par deux systèmes différents : l'un basé sur la morphologie et l'autre sur les caractéristiques fonctionnelles des follicules.

Jusqu'au stade pré-antral, le développement des follicules est largement contrôlé par un dialogue moléculaire via des facteurs de croissance (BMPs, FGFs, KITL par exemple) entre l'ovocyte et les cellules somatiques qui l'entourent (granulosa et thèque). Dès le stade primaire de développement du follicule, l'ovocyte synthétise du GDF9, qui soutient la transition vers le stade folliculaire secondaire (Dong et al., 1996). Chez la brebis, et probablement chez la femme, c'est BMP15 qui jouerait ce rôle (Otsuka et al., 2011; Persani et al., 2014). GDF9 et BMP15 produits par l'ovocyte activent leur voie de signalisation SMAD dans les cellules de la granulosa et favorisent leurs proliférations et leurs survies, alors que le KITLG produit par les cellules de la granulosa active la voie PI3K/AKT essentielle à la croissance et à la survie de l'ovocyte (Monniaux, 2016). Les cellules thécales nouvellement formées contribuent aussi à cette progression dans la folliculogénèse basale par la synthèse d'androgènes et de facteurs de croissance (BMP4, BMP7, NGF, FGF7, EGF, TGF  $\alpha$ ), qui renforcent la prolifération des cellules de la granulosa. Inversement, les cellules de la granulosa contrôlent l'expression des gènes et l'activité sécrétoire de la thèque par la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines, en particulier KITLG (Hutt et al., 2006). En opposition à ces signaux stimulant la croissance folliculaire, les cellules de la granulosa produisent également de l'AMH qui inhibe la croissance des petits follicules à partir de leur activation (Durlinger et al., 1999). Cette folliculogénèse basale peut se dérouler en absence d'hormones gonadotropes, mais les cellules folliculaires y sont sensibles. La sensibilité à la FSH (Folliculo-Stimulating Hormone) augmente progressivement, à mesure que divers facteurs (IGF1, insuline, androgènes, etc.) induisent des récepteurs de la FSH et/ou amplifient l'action de la FSH sur les cellules de la granulosa (Figure 20).

#### b) Croissance folliculaire terminale, ovulation et cyclicité

À partir du stade antral, la folliculogénèse terminale est plus particulièrement sous un contrôle endocrine via sa dépendance aux hormones gonadotropes FSH et LH (Luteinizing Hormone), mais de nombreux autres facteurs (facteurs de croissance, matrice extracellulaire, stéroïdes) interviennent également pour agir en synergie avec les gonadotropines (McGee and Hsueh, 2000). La durée de cette croissance terminale est de 3 à 4 jours chez la brebis et présente un caractère cyclique via un dialogue hormonal entre les ovaires, l'hypophyse et l'hypothalamus.

Au niveau folliculaire, il y a accroissement du volume de l'antrum, développement de la vascularisation thécale, diminution de l'activité de prolifération des cellules de granulosa et différenciation des cellules de la granulosa et de la thèque en cellules stéroïdogènes (Edson et al., 2009). En effet, la différenciation des cellules de la granulosa est caractérisée, sous l'influence de la

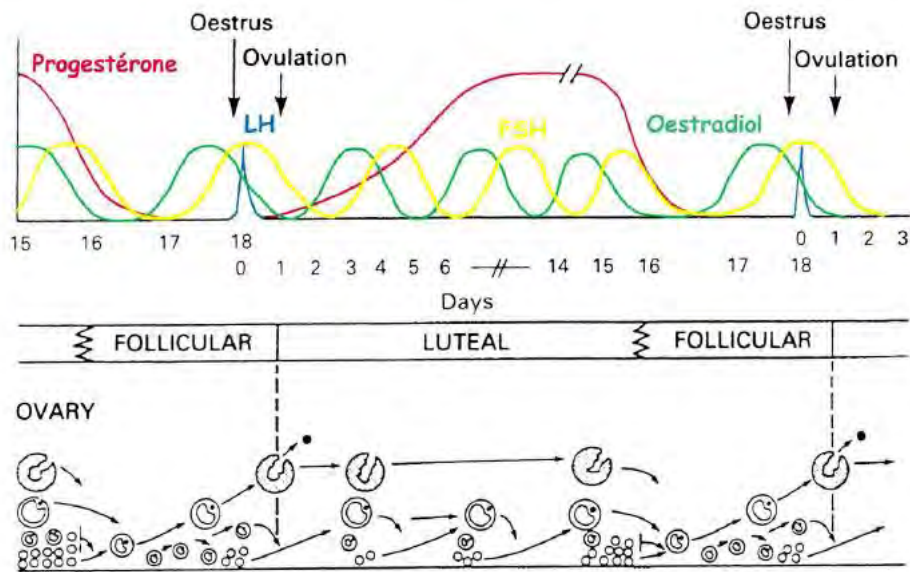


Figure 21: Sécrtions hormonales au cours du cycle oestrien de la brebis.

(McNeilly et al. 1992) Pendant la phase folliculaire qui se déroule entre J16 et J18 (J0 = pic de LH), la maturation folliculaire s'accompagne d'une production d'oestradiol. Une fois le seuil atteint, ce stéroïde déclenche le pic pré-ovulatoire de LH par un rétrocontrôle positif sur le complexe hypothalamo-hypophysaire. L'ovulation a lieu 21 heures après ce pic. Après l'ovulation et pendant toute la phase lutéale, des fluctuations de FSH génèrent de nouvelles vagues de croissance folliculaire terminale. La formation du corps jaune caractérise cette phase, celui-ci sécrète la progestérone qui inhibe alors la sécrétion de LH. En fin de phase lutéale, on assiste à la régression rapide du corps jaune. Le rétrocontrôle négatif de la progestérone sur la sécrétion de LH est levé, la fréquence des pulses de LH augmente, marquant le début d'une nouvelle phase folliculaire.

FSH, par l'apparition et une forte expression des gènes de la stéroïdogénèse, CYP11A1, STAR, HSD3B2 et surtout CYP19A1 qui code pour l'aromatase responsable de la synthèse d'œstradiol (synthétisé à partir des androgènes thécaux). C'est lors de cette phase terminale que les cellules de la granulosa font l'acquisition des récepteurs à la LH (LHCGR), dont le nombre augmente jusqu'au stade préovulatoire (follicules de 6-8 mm de diamètre chez la brebis). La FSH augmente également l'expression de nombreux gènes, en particulier ceux codant pour les sous-unités inhibine/activine (INHA, INHBA, INHBB). Mais dans le même temps, on observe une perte de l'activité de synthèse de l'AMH (Nilsson et al., 2011). Les conséquences du dialogue endocrinien entre l'ovaire et l'axe hypothalamo-hypophysaire au cours de cette phase de croissance terminale se traduisent par des changements de concentrations hormonales illustrés par la Figure 21 au cours d'un cycle oestrien (McNeilly et al., 1992).

Lors de cette phase, la taille de la cohorte des follicules entrant dans cette phase terminale conduisant à l'ovulation est proportionnée au nombre d'ovulations caractéristique de l'espèce, c'est le phénomène de sélection (Webb et al., 2016). Cette sélection est associée à une diminution des niveaux circulants de FSH sous l'effet négatif des hormones ovariennes, œstradiol et inhibine sur l'hypophyse. Dans le même temps, la montée d'œstradiol va s'accompagner du comportement d'œstrus (acceptation du chevauchement par le mâle) et va également exercer un rétrocontrôle positif au niveau de l'hypothalamus, en augmentant la pulsativité du GnRH (Gonadotropin Releasing Hormones) qui va se répercuter sur la pulsativité de LH au niveau hypophysaire (environ 1 pulse par heure).

Au niveau ovarien, la baisse du niveau de FSH s'accompagne donc d'une augmentation de la pulsativité et des niveaux de LH. Cette dernière permet au follicule le mieux adapté, ayant acquis des récepteurs à LH en surface des cellules de granulosa, de poursuivre son développement, en s'affranchissant de la baisse de FSH. Les autres follicules débutent alors un processus d'atrésie puisque leur croissance n'est plus soutenue par la FSH. La pulsativité de LH va s'accélérer sous l'influence de l'œstradiol jusqu'à déclencher la décharge ovulatoire. Comme indiqué précédemment, cette phase de croissance terminale présente un caractère cyclique. Au cours d'un cycle dit « oestrien » qui se met en place à la puberté, la phase de croissance folliculaire terminale correspond à la phase folliculaire de ce cycle (Figure 21).

Quelques heures après la décharge ovulatoire de LH, par une réaction de type inflammatoire, le follicule libère l'ovocyte entouré de cellules du cumulus, c'est l'ovulation. Les cellules de granulosa et de la thèque se transforment en cellules lutéales et forment le corps jaune.



Elles sécrètent majoritairement de la progestérone indispensable pour la mise en place de la gestation. Pour certaines espèces (rate, femme et truie), le corps jaune peut également sécréter de l'œstradiol. Le corps jaune évolue au cours du temps, avec une période de croissance au cours de laquelle son activité de sécrétion de progestérone se maintient et il devient sensible aux prostaglandines. Cette sécrétion entraîne l'inhibition de la libération de GnRH, donc la sécrétion de LH (en limitant la pulsativité à 1 pulse toute les 6 heures). Si aucune fécondation ne se produit, la sécrétion par la muqueuse utérine d'une hormone lutéolytique, la prostaglandine F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ), entraîne la régression du corps jaune et donc l'arrêt de la sécrétion de progestérone. C'est la lutéolyse. La période entre la formation du corps jaune à l'ovulation, à sa régression constitue la phase lutéale du cycle oestrien et dure une quinzaine de jours chez la brebis, pour une durée totale du cycle de 16 à 18 jours. À la fin de cette phase lutéale, on observe alors une reprise de l'activité ovarienne et le début d'un nouveau cycle par l'arrêt du rétrocontrôle négatif de la progestérone sur l'hypothalamus (Castonguay, 2018; Montmeas et al., 2013).

## 2) L'atrésie folliculaire

L'aboutissement d'une folliculogénèse complète du follicule primaire jusqu'à l'ovulation est un phénomène très rare au vu du stock de follicules. En fait, la dégénérescence des follicules, ou atrésie folliculaire, représente le devenir de plus de 99% des follicules en croissance chez les mammifères. Elle affecte principalement les stades préantral à début d'antrum chez les rongeurs et les petits follicules à antrum de la vague de croissance terminale chez les mammifères de plus grande taille. Au stade antral, cette atrésie se caractérise par un arrêt de la prolifération et la mort par apoptose des cellules de la granulosa, en particulier par activation de la voie FAS et du récepteur du TNF $\alpha$ , créant un déséquilibre en faveur des facteurs pro-apoptotiques BAX et au détriment des facteurs anti-apoptotiques BCL2 (Hakuno et al., 1996; Matsuda et al., 2012; Quirk et al., 1995). L'atrésie s'accompagne également de la perte des jonctions entre les cellules de la granulosa et la réduction de la vascularisation thécale. Dans les follicules en croissance terminale, l'atrésie s'accompagne également de la perte d'expression et d'activité de l'aromatase et de la sensibilité aux gonadotropines FSH et LH des cellules de la granulosa, conduisant à la chute du rapport œstrogène/androgène dans le liquide folliculaire (Monniaux et al., 1999). Ce phénomène jouerait indirectement un rôle important dans la régulation du taux d'ovulation. La grande quantité d'œstradiol, d'androstènedione et d'inhibine A, sécrétée par les follicules sensibles à la gonadotrophine réduit les concentrations de FSH sous le seuil nécessaire au maintien des autres follicules indépendants. Ainsi, la domination du ou des follicules potentiellement ovulatoires

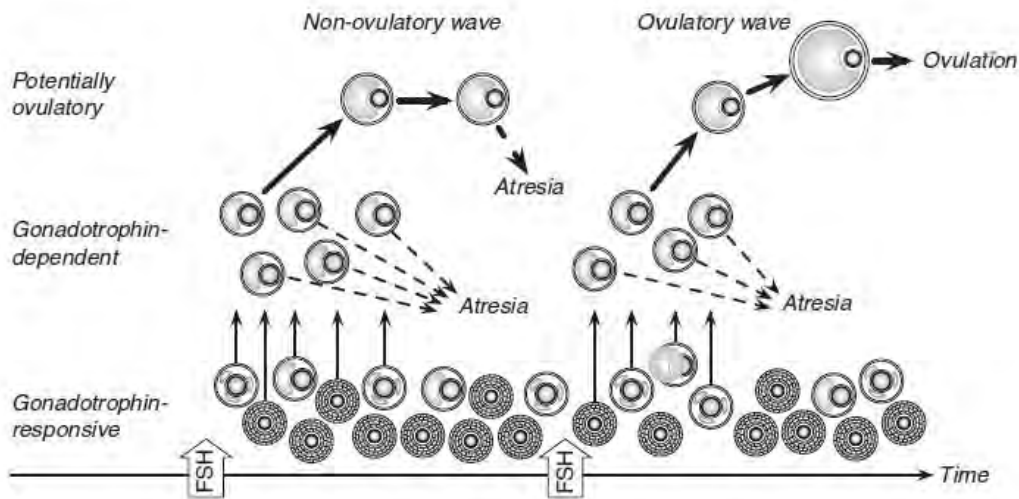


Figure 22: Vagues folliculaire dans les stades terminaux de la croissance folliculaire chez les ruminants.

(Scaramuzzi et al. 2011) La croissance jusqu'au stade follicules sensibles aux gonadotrophines est quasiment linéaire, ce qui garantit un apport continu de ce type de follicules. Sous l'influence de la FSH, ces follicules sensibles deviennent dépendants aux gonadotrophines dans un processus reflétant la dynamique de la boucle de rétroaction négative entre l'œstradiol, l'inhibine et la FSH hypophysaire. Un pic de FSH (indiqué par les flèches) conduit à l'émergence d'un groupe de follicules dépendants, avec un seuil de sensibilité plus élevé pour la FSH que les follicules sensibles. Un ou plusieurs follicules potentiellement ovulatoires émergent de ce groupe et, parmi eux un (des) potentiel(s) follicule(s) fonctionnellement dominant. Celui-ci sécrète suffisamment d'œstradiol et d'inhibine pour inhiber la synthèse de la FSH et ainsi favoriser l'atrésie des follicules dépendants restants et empêcher l'émergence d'une nouvelle cohorte. En présence d'un corps jaune (vague non ovulatoire), le ou les follicules dominants deviennent atrétiques au bout de 4 à 5 jours, sécrétant moins d'œstradiol et d'inhibine, de sorte que la FSH peut augmenter et déclencher une nouvelle vague. Si le corps jaune a régressé, il se forme une vague ovulatoire et le ou les follicules dominants ovulent.

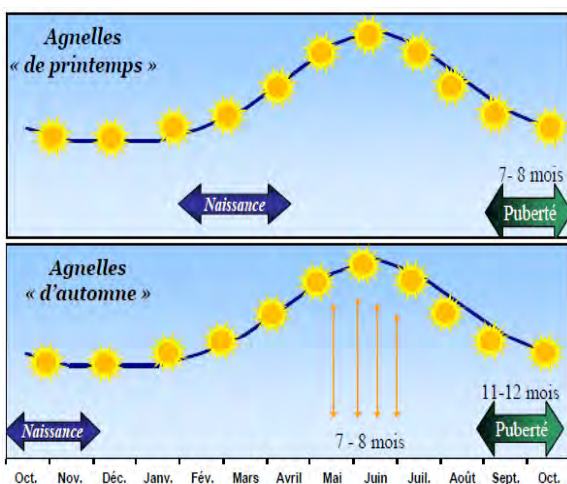


Figure 23: Puberté des agnelles sous lumière naturelle en fonction du mois de naissance.

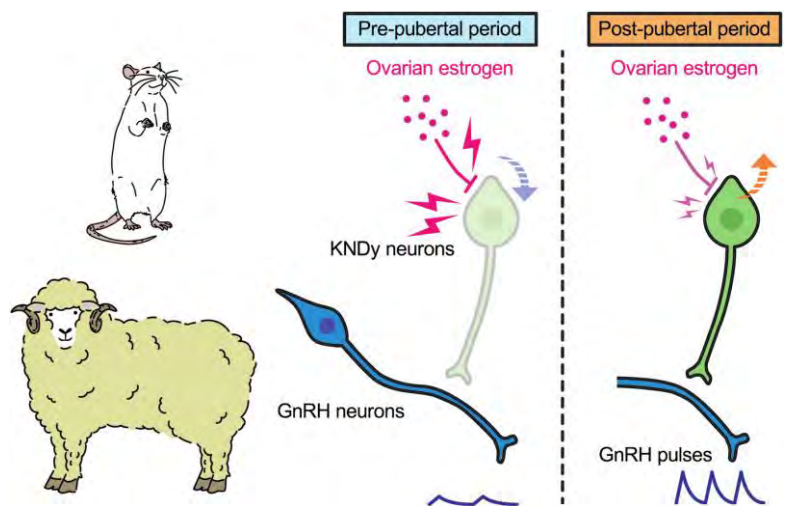


Figure 24: Rôle des neurones KNDY dans l'apparition de la puberté.

(Uenoyama et al. 2019) Chez le rat et le mouton, en période pré-pubère, les oestrogènes ovariens inhibent la synthèse de kisséptine par les neurones KNDY (Kisséptine/Neurokinine B/Dynorphine A). En période post-pubère, le contrôle négatif des oestrogènes diminue, permettant une augmentation de la libération pulsatile de kisséptine qui va agir sur les neurones à GnRH pour déclencher une sécrétion pulsatile de GnRH.



provoque une atrophie chez les membres restants de la cohorte qui n'ont pas réussi à passer de la dépendance absolue aux gonadotrophines de la FSH à la LH et ne peuvent donc pas continuer à fonctionner en présence de faibles concentrations de FSH (Campbell et al., 1999). En présence d'un corps jaune (vague non ovulatoire, Figure 22), le ou les follicules dominants deviennent atrophiques au bout de 4 à 5 jours, sécrétant moins d'œstradiol et d'inhibine, de sorte que la FSH peut augmenter et déclencher une nouvelle vague. Si le corps jaune a régressé, il se forme une onde ovulatoire et le ou les follicules dominants ovulent (Figure 22).

### 3) La puberté

La puberté est un processus graduel au cours duquel les animaux acquièrent la maturité sexuelle, c'est-à-dire leur capacité à se reproduire. Chez les ovins, la puberté intervient entre 6 et 9 mois, ce délai différant selon le sexe, la race, les conditions corporelles (balance énergétique) ou encore la saison de naissance (Figure 23) (Castonguay et al., 1990; Castonguay, 2018; Chiquette et al., 1984; Dudouet, 2016; Quirke, 1981). Chez l'agnelle, on estime que la puberté intervient au moment où l'animal atteint 40 à 60% de son poids adulte estimé (Kenyon et al., 2014). La puberté chez l'agnelle peut être associée à des critères comportementaux comme l'œstrus et/ou hormonaux par l'augmentation de la pulsativité de GnRH et LH, ou encore l'élévation de la concentration plasmatique de progestérone en lien avec l'accomplissement de la phase terminale de la folliculogénèse et les premières ovulations. En effet, les follicules ovariens sont fonctionnels et l'axe gonadotrope est réceptif avant même le début de la puberté. Toutefois, ce dernier est sous l'influence du rétrocontrôle négatif exercé par les oestrogènes, empêchant ainsi la synthèse de GnRH par les neurones hypothalamiques dédiés. Cet effet passe par l'intermédiaire des neurones KNDy (kisséptine/neurokinine B/dynorphine A) sensibles à l'œstradiol et libérant la kisséptine (produit du gène *KISS1*) de façon pulsatile, et connectés aux neurones à GnRH (Figure 24; Uenoyama et al., 2019). Il est à noter que la découverte de la kisséptine, sécrétagogue de la GnRH, et de son récepteur GRP54, en tant que régulateur majeur de l'apparition de la puberté fut une avancée majeure en neuroendocrinologie de la reproduction au cours de ces 15 dernières années. Une à trois semaines avant la puberté, la sensibilité aux effets rétroactifs des oestrogènes diminue progressivement, ce qui entraîne une augmentation de la fréquence de la pulsativité de LH (Foster and Ryan, 1979; Huffman et al., 1987; Keisler et al., 1983; Ryan et al., 1991). Les niveaux circulants de LH ainsi augmentés améliorent le développement et la maturation des follicules ovariens produisant suffisamment d'œstradiol pour induire un œstrus comportemental et une élévation des

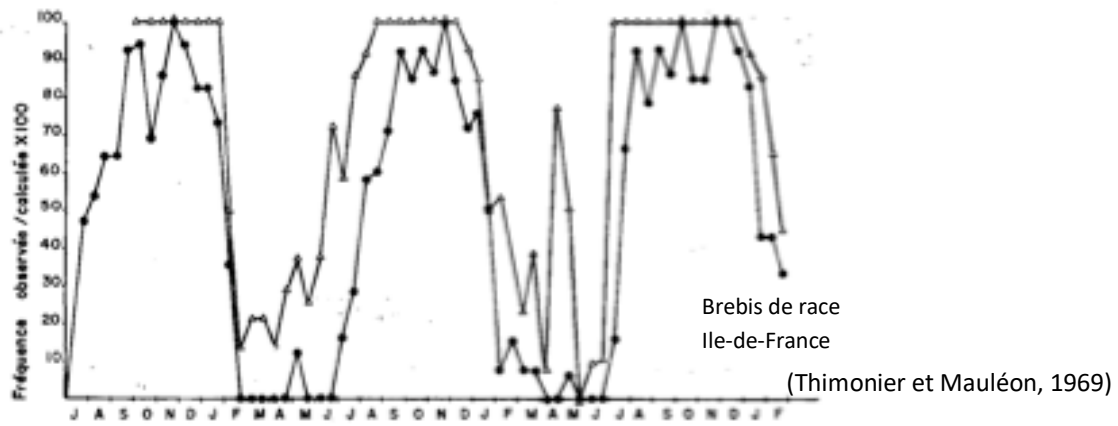


Figure 26: Variations annuelles de la fréquence du comportement d'œstrus (●) et de l'ovulation (Δ) chez la brebis.

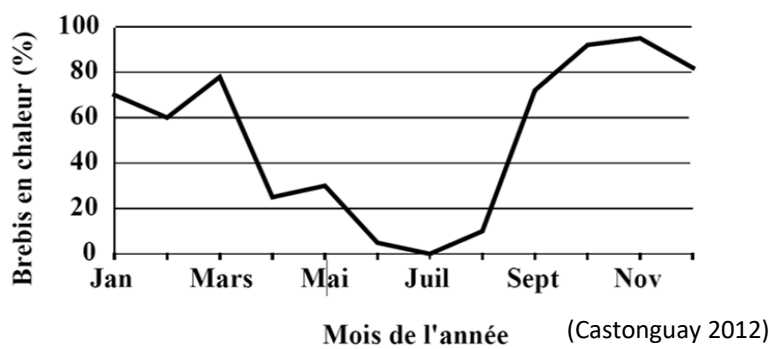


Figure 25: Schématisation de l'activité sexuelle saisonnière chez la brebis.

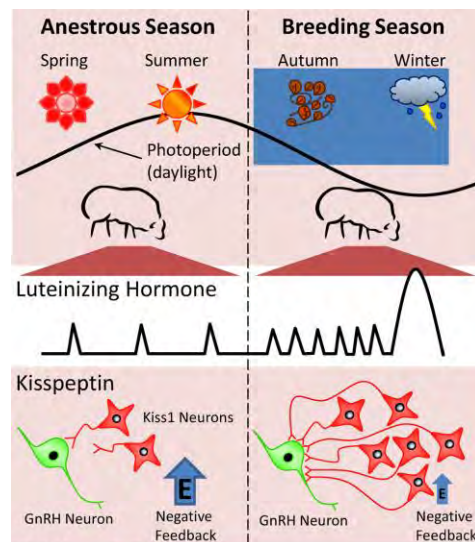


Figure 27: Contrôle de la saisonnalité de la reproduction chez la brebis.

(Smith, Clarke, 2010) Les changements dans la photopériode déterminent la saison de reproduction (Automne, Hiver, en bleu) chez la brebis. Cette période est caractérisée par une augmentation de la fréquence des pulses de LH conduisant à la décharge ovulatoire et une augmentation du nombre de neurones à kisspeptine et à leurs connexions avec les neurones à GnRH, dans un contexte de diminution du rétrocontrôle négatif de l'oestradiol (E).

concentrations de gonadotrophines avant l'ovulation (Foster and Ryan, 1981; Roa et al., 2011; Seminara et al., 2003).

Cette première ovulation est suivie d'une première augmentation de la sécrétion périphérique de progestérone dépassant 0,5 ng/ml de sang chez les agnelles. Mais deux cas de figures peuvent se présenter, soit cette sécrétion de progestérone perdure sur une durée de phase lutéale classique de 12 jours, soit une ou plusieurs phases lutéales de courte durée (2 à 6 jours) avec une l'augmentation de la progestérone de faible amplitude (1 à 2 ng /ml) (Fitzgerald and Butler, 1982; Ryan et al., 1991; Valasi et al., 2006, 2009). Ces premiers cycles dits « cycles courts » ne sont généralement pas précédés par un œstrus comportemental (Valasi et al., 2006, 2009).

#### 4) Saisonnalité de la cyclicité

Comme indiqué précédemment, la saison de l'année influence la physiologie ovarienne chez la brebis. En effet, la brebis est une espèce poly-oestrienne saisonnière à jours courts, ce qui signifie qu'elle présente une succession d'œstrus pendant les périodes d'automne et d'hiver (Figure 26 ; Thimonier and Mauléon, 1969)). En général, la saison naturelle de reproduction a lieu de septembre à janvier et les agneaux naissent au printemps (Figure 25). Le reste de l'année correspond à une période de repos sexuel, on parle aussi d'anoestrus saisonnier. Les variations de l'activité sexuelle résultent d'un changement dans le photopériodisme (jours courts/jours longs) utilisant la mélatonine produite la nuit par la glande pinéale comme intermédiaire dans la transmission du signal lumineux vers l'hypothalamus. Cette intégration de la photopériode influence la sécrétion de GnRH, via les neurones KNDy et par voie de conséquence modifie la sécrétion des hormones gonadotropes (LH et FSH ; Figure 27) nécessaires à la phase terminale de la folliculogénèse et à l'ovulation (Forcada et al., 2002; Malpoux et al., 1996).

### C. Conséquences des mutations du système BMP associées à l'hyperproliférite sur la fonction ovarienne

Nous allons aborder les conséquences des mutations hyperprolifériques des gènes *Fec* dans le contrôle de la folliculogénèse et la régulation du nombre d'ovulations chez la brebis.

De nombreux facteurs de croissance BMP sont spécifiquement ou principalement exprimés par l'ovocyte (BMP15, GDF9 et BMP6), les autres étant exprimés par les cellules folliculaires somatiques, de la granulosa et les thèques (BMP4 et BMP7).

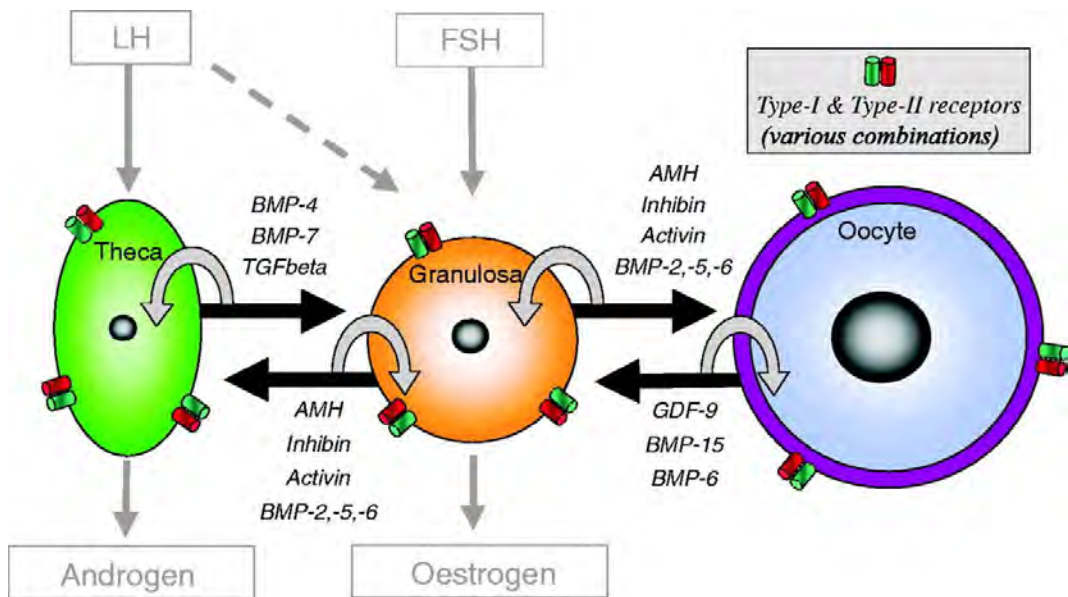


Figure 28: Facteurs de la famille du TGFβ impliqués dans les communications bidirectionnelles entre les cellules de la thèque, de la granulosa et l'ovocyte.

(Knight et Glistler 2006) Les événements probables de signalisation autocrine (flèches grises pleines) et paracrine (flèches noires), selon l'expression de combinaisons appropriées de récepteurs de type I et de type II aux ligands de la famille du TGFβ à la surface cellulaire.

Tous les compartiments cellulaires du follicule, spécialement les cellules de la granulosa, sont équipés des récepteurs BMP et sont donc des cibles de l'action biologique des BMPs depuis le stade primaire jusqu'au stade follicule à antrum et l'ovulation. La présence des ligands et des récepteurs indique la possibilité d'une intégration intracellulaire du signal BMP au sein de l'ovaire (Figure 28). Les études des Smads, au niveau de l'ovaire, concernent essentiellement les Smads 2 et 3 activables par la voie TGF/activine. Toutefois Moore et al., ont montré la phosphorylation de Smad1 dans les cellules de granulosa de rate, en présence de BMP15, BMP6 et BMP7 (Moore et al., 2003). La nature et la localisation des membres de cette famille BMP dans l'ovaire de brebis semblent similaires à ce qui a été décrit chez les rongeurs (Fabre et al., 2006).

### 1) *FecB* / *BMPR1B*

Au niveau ovarien, les brebis *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>* en comparaison aux brebis sauvages, présentent des follicules ovulatoires plus nombreux (reflétant le taux d'ovulation pouvant être supérieur à 5), plus petits et matures plus précocement (Driancourt et al., 1985; Henderson et al., 1987; McNatty et al., 1986; McNatty and Henderson, 1987). Ces observations s'expliquent par une dynamique de la phase folliculaire terminale modifiée chez les brebis *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>*. Les follicules pré-ovulatoires atteignent leur taille maximale plus tôt (3-5mm vs 7-8mm chez les brebis non mutées) et se maintiennent tels quels jusqu'à l'ovulation (Driancourt et al., 1986). Le nombre total de cellules de granulosa des follicules œstrogéniques par animal est similaire entre les brebis *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>* et *FecB<sup>+</sup>/FecB<sup>+</sup>* (McNatty et al., 1986). De plus, il n'y a pas de différence au niveau des sécrétions hormonales ovariennes de progestérone, d'œstradiol et d'inhibine A, entre les deux génotypes, mais la concentration circulante d'AMH est très diminuée chez les brebis *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>* (Souza et al., 1997, Estienne et al., 2015). Néanmoins, cet effet de *FecB<sup>B</sup>* particulièrement visible sur la folliculogénèse lors de la phase terminale, pourrait commencer bien plus précocement dès la formation des follicules chez le fœtus (Reader et al., 2012).

Différentes approches ont étudié l'ensemble de l'axe reproductif des brebis afin de mettre en évidence le(s) tissu(s) cible(s) de la mutation *FecB<sup>B</sup>*. Au niveau hypothalamo-hypophysaire, les concentrations et les sécrétions de GnRH ne sont pas affectées par la mutation *FecB<sup>B</sup>*. Des brebis de chaque génotype *FecB<sup>+</sup>/FecB<sup>+</sup>* vs. *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>* ont été rendues déficientes en GnRH endogène par ablation chirurgicale de l'hypothalamus. Suite à l'addition pulsatile de GnRH exogène, le taux d'ovulation naturel n'a pas été modifié chez ces brebis, le taux supérieur d'ovulation étant conservé chez les brebis *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>* (McNatty et al., 1993). Concernant la FSH, toutes les observations ne vont pas dans le même sens. Dans un premier temps, il a été observé une augmentation de la



concentration plasmatique de FSH en présence de la mutation (Bindon et al., 1985; McNatty and Henderson, 1987). Cependant, une autre étude ne trouve aucune différence de sécrétion des hormones gonadotropes entre les deux génotypes (Souza et al., 1997). Le nombre d'ovulations étant directement influencé par la FSH chez la brebis (McNatty et al., 1985), des brebis ont été hypophysectomisées afin de supprimer les hormones gonadotropes endogènes. Des doses de gonadotrophine similaires ont été administrées aux deux génotypes, les brebis mutées *FecB<sup>B</sup>* révélant toujours un nombre d'ovulations plus élevé que les brebis homozygotes sauvages. L'ensemble de ces observations indiquent un rôle prépondérant de la mutation au niveau ovarien.

À l'échelle cellulaire, *BMPR1B* (ARNm et protéine) est exprimé dans l'ovocyte et les cellules de granulosa depuis le stade de follicule primordial jusqu'au stade de follicule à antrum (Fabre et al., 2006; Wilson et al., 2001). Par ailleurs, les travaux de McNatty et Henderson (1987) ont montré que les cellules de la granulosa *FecB<sup>B</sup>* présentaient une activité proliférative réduite et une maturité précoce se traduisant par l'acquisition d'une sensibilité aux hormones gonadotropes (FSH puis LH) (Fabre et al., 2006; Pierre et al., 2004) et d'une capacité de synthèse des stéroïdes (Campbell et al., 2006) plus précoces au cours du développement folliculaire par rapport aux cellules de granulosa *FecB<sup>+</sup>*. En effet, les cellules de la granulosa de follicules antraux *FecB<sup>B</sup>* affichent une densité plus élevée des récepteurs FSHR et LHCGR pour la FSH et la LH, respectivement (Regan et al., 2015). Les niveaux intra-folliculaire d'AMH plus faibles pourraient également permettre aux cellules folliculaires de développer une plus grande sensibilité aux hormones gonadotropes (Estienne et al., 2015; Fabre et al., 2006; Pierre et al., 2004). L'expression de *BMPR1B* lui-même apparaît plus importante dans les cellules de la granulosa mutées que ce soit au niveau ARNm (Bahire et al., 2019) ou protéique en surface des cellules (Regan et al. 2015). Pourtant, l'expression des effecteurs SMADs est réduite dans les ovaires *FecB<sup>B</sup>*, laissant supposer une moindre activité de la voie de signalisation chez les brebis *FecB<sup>B</sup>/FecB<sup>B</sup>* (Bahire et al., 2019).

C'est en effet, un rôle « perte de fonction » partielle de la mutation *FecB<sup>B</sup>/BMPR1B<sup>Q249R</sup>* localisée dans le domaine kinase du récepteur (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001; Wilson et al., 2001), sur l'activité du récepteur *BMPR1B* qui aurait pour conséquence une altération de la réponse des cellules de granulosa aux ligands spécifiques de *BMPR1B*, tels que *BMP4* ou *BMP15* (Estienne et al., 2015; Fabre et al., 2003). La stimulation de la prolifération des cellules de la granulosa et l'inhibition de la synthèse de progestérone induit par ces ligands est effectivement réduite en présence de la mutation (Estienne et al., 2015; Fabre et al., 2003; Mulsant et al., 2001; Pierre et al., 2004).

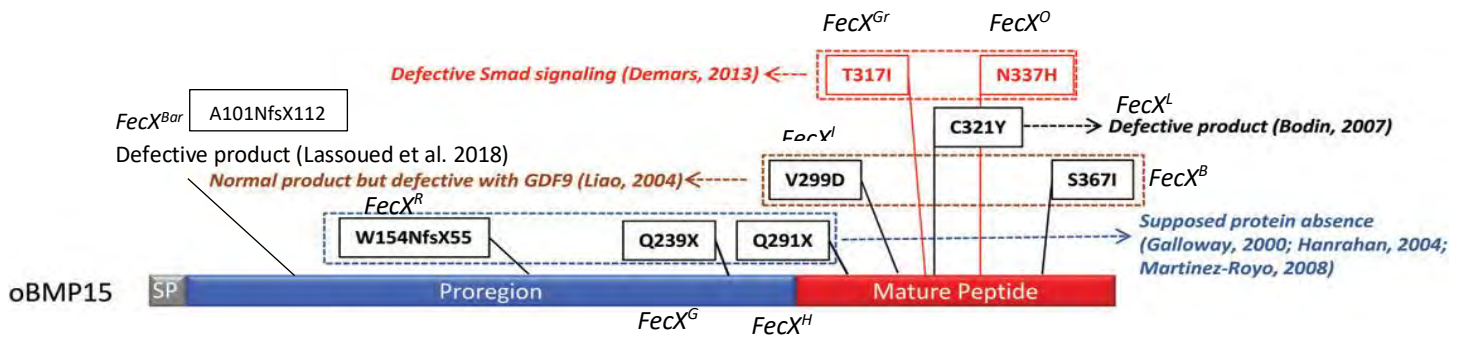


Figure 29: Illustration schématique des variantes connues de BMP15 identifiées chez les ovins avec des altérations du nombre d'ovulations et de la fertilité.

(Adaptée Persani et al. 2014) Les variants en noir induisent une hyperprolificité à l'état hétérozygote, mais une stérilité à l'état homozygote en raison d'un blocage de la folliculogénèse aux premières étapes. Les variants en rouge augmentent le nombre d'ovulations de manière dose-dépendante en fonction du nombre de copie de l'allèle muté. L'impact fonctionnel prédit par la nature de la variation ou par les études in vitro est également rapporté. Les positions des acides aminés sont données par rapport au BMP15 ovin (NP\_001108239). SP :peptide signal.

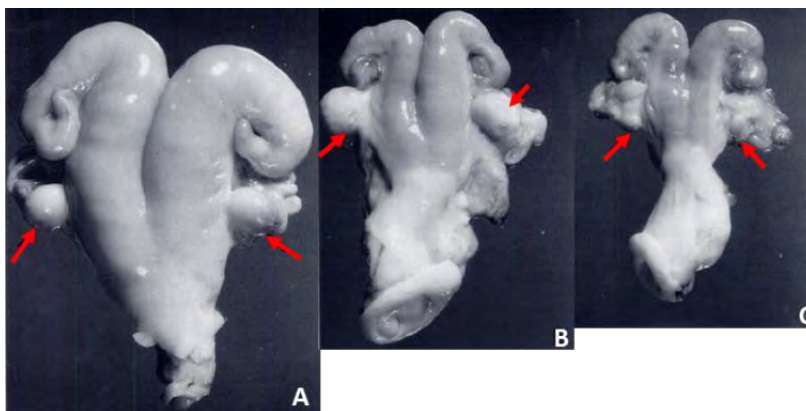


Figure 30: Tractus génitaux de brebis Romney sauvage et Inverdale.

(Davis et al. 1992) (A) Tractus normal de brebis sauvage de 1,5 ans, (B) tractus normal de brebis prépubère sauvage de 8 mois, et (C) tractus anormal de brebis Inverdale  $FecX^l$  de 1,5ans. Les trois photographies sont à la même échelle. Les flèches rouges indiquent les ovaires.



La signalisation du système BMP via BMPR1B jouerait donc un rôle important sur la stimulation de la prolifération, l'inhibition de la sensibilité aux gonadotropines et de la capacité stéroïdogène des cellules de la granulosa. Dans le cas d'ovaires mutés pour *BMPR1B*, l'activité de signalisation du système BMP est réduite, diminuant ainsi la prolifération, avec moins de granulosa par follicules (ceux-ci sont donc plus petits), et favorisant une avance à la maturation folliculaire terminale par une meilleure sensibilité aux hormones gonadotropes. Il en résulte des follicules prêts à ovuler plus tôt dans un environnement endocrinien inchangé.

## 2) *FecX* / *BMP15*

Au niveau ovarien, les brebis homozygotes pour les mutations *FecX<sup>H,R,G,Bar et L</sup>* dans *BMP15* (Figure 29) présentent toutes une hypoplasie utérine et ovarienne (Figure 30) qui se caractérise par une incapacité des follicules ovariens à dépasser le stade primaire du développement folliculaire (Figure 31) (Bodin et al., 2007; Braw-Tal et al., 1993; Davis et al., 1992; Lassoued et al., 2017). Ce phénotype ovarien est à l'origine de niveaux d'œstradiol et d'inhibine indétectables (Shackell et al., 1993), qui se répercutent sur le tractus génital peu développé (Figure 30) et au niveau hypophysaire par des niveaux circulants de FSH et de LH anormalement élevés chez les brebis homozygotes *Inverdale*, similaires à ceux de brebis ovariectomisées. Les mutations *FecX<sup>H,R,G,Bar et L</sup>* entraînant un décalage du cadre de lecture ou bien l'apparition prématurée d'un codon stop empêchent la production de la protéine BMP15 fonctionnelle (Bodin et al., 2007; Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017; Liao et al., 2003; Martinez-Royo et al., 2008). Ainsi le blocage au stade primaire de la folliculogénèse des brebis stériles indique que BMP15 est indispensable à la transition vers la formation des follicules secondaires. À l'inverse des brebis homozygotes, les brebis hétérozygotes *FecX<sup>l</sup>/FecX<sup>+</sup>*, qui sont prolifiques, ont des ovaires semblables à ceux observés chez les brebis *Booroola*, avec un nombre plus élevé de follicules à antrum, plus petits et matures plus précocement. Pour autant, les sécrétions plasmatiques ovariennes (œstradiol, inhibine, progestérone) ne sont pas différentes à celles des brebis non mutées (Shackell et al., 1993). Au niveau hypophysaire, les taux plasmatiques de LH et de FSH sont également similaires entre les deux génotypes. À l'état hétérozygote, la mutation *FecX<sup>l</sup>*, à l'image de la mutation *Booroola FecB<sup>B</sup>*, montre un phénotype strictement ovarien, sans altération des sécrétions d'hormones ovariennes et hypothalamo-hypophysaires.

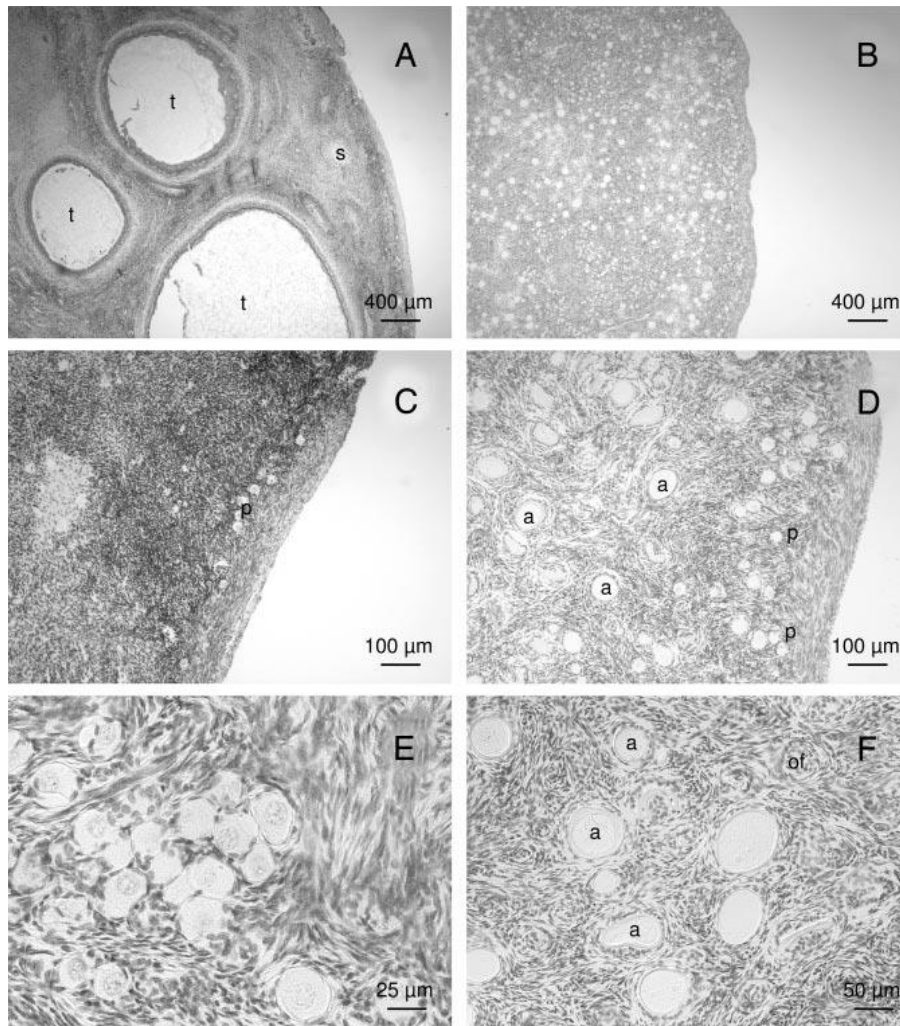


Figure 31: Coupes histologiques d'ovaires homozygotes  $FecX^L/FecX^L$ .

(Bodin et al. 2007) Photographies de sections histologiques d'ovaires sauvages (A et C) ou homozygotes mutés  $FecX^L/FecX^L$  (B et D-F). (A) : Evidence de croissance folliculaire avec la présence de follicules secondaires (s) et tertiaires (t) dans les ovaires normaux. (B) : ovaires  $FecX^L/FecX^L$  remplis de nombreux follicules primordiaux (p) comparés aux ovaires sauvages (A et C) sans follicule secondaire ni tertiaire. D : cortex d'ovaires  $FecX^L/FecX^L$  avec des follicules primordiaux (p) et de nombreuses structures folliculaires anormales (a). E : nombreux ovocytes adjacents organisés en cluster. F : présence de structures folliculaires dépourvues d'ovocyte (of) et de nombreux follicules primaires anormaux (a) montrant de larges ovocytes avec une fine zone pellucide entourée de couches de cellules de granulosa désorganisées.

À l'échelle cellulaire, BMP15 (ARNm et protéine) est exprimé très préférentiellement dans les ovocytes des follicules en croissance avec un optimum d'expression entre les stades de follicules primaire et pré-ovulatoire (Galloway et al., 2000; McNatty et al., 2004; Otsuka et al., 2000). L'utilisation *in vitro* de BMP15 recombinante sur des cellules de granulosa a mis en évidence son rôle potentialisateur sur la prolifération des cellules de granulosa (McNatty et al., 2005; Otsuka et al., 2000), son rôle inhibiteur sur la sensibilité à FSH (Fabre et al., 2006; Otsuka et al., 2001), et son rôle potentialisateur dans le dialogue ovocyte-granulosa via l'expression du Kit ligand, un facteur nécessaire à la croissance de l'ovocyte dans les follicules au stade pré-antral (Otsuka and Shimasaki, 2002). Les actions de BMP15 sont régulées par la follistatine, fortement exprimée dans le follicule dominant. Cette régulation permet de maintenir la réactivité des cellules de la granulosa à la FSH. De plus, il a été montré que Foxo3, une molécule de signalisation, était capable de réduire la croissance des ovocytes et le développement folliculaire en inactivant BMP15 (Liu et al., 2007). Une action inhibitrice de BMP15 sur la sécrétion de progestérone par la régulation décroissante STAR dans les lignées de cellules de granulosa humaines a été démontrée (Chang et al., 2013). A l'inverse, BMP15 a une action stimulante de l'expression et de la sécrétion d'AMH (Pierre et al., 2016). De plus, il a été démontré que BMP15 contrôle l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cumulus (Caixeta et al., 2013; Su et al., 2008), de l'expansion (Li et al., 2009), et qu'il augmente la compétence de développement des ovocytes (Hussein et al., 2006).

Deux autres mutations sont connues dans le gène *BMP15*, *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecX<sup>O</sup>*, n'induisant pas de stérilité à l'état homozygote mutant (Demars et al., 2013) mais qui exacerbe le phénotype hyperproliférique. Ces deux mutations sont localisées dans le domaine mature de la protéine portant l'activité biologique (Figure 29). Si elle n'empêchent pas la production de protéine BMP15, à l'image des mutations citées précédemment, ces deux mutations altèrent négativement son activité de signalisation via les récepteurs aux BMPs et la protéine SMAD1 (Demars et al., 2013).

Ainsi, BMP15 exerce donc un rôle important sur la stimulation de la prolifération et l'inhibition de la différenciation/maturation des cellules de granulosa en diminuant leur sensibilité aux effets des gonadotropines au cours de la folliculogénèse (McNatty et al., 2009; Shackell et al., 1993). Dans le cas des brebis hétérozygotes *FecX* mutées, la perte de fonction partielle de BMP15 (une demi-dose) est responsable, « tout comme » celle de *BMPR1B*, d'une inhibition de la prolifération des cellules de la granulosa (follicules plus petits) mais d'une avance à la maturation folliculaire terminale, les follicules étant prêts à ovuler plus tôt.

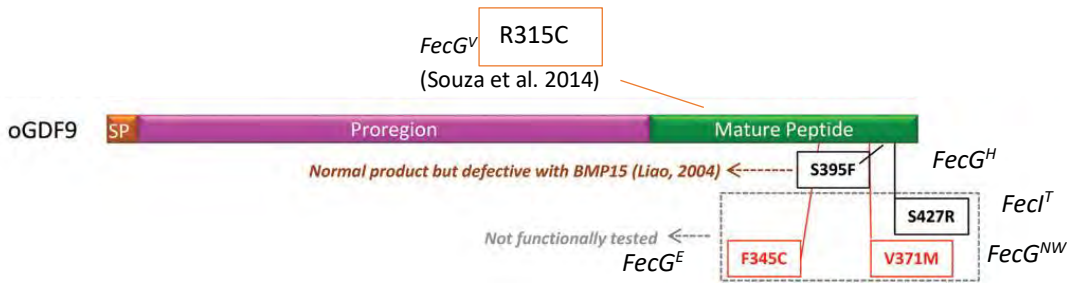


Figure 32: Illustration schématique des variants connus de GDF9 identifiés chez les ovins avec des altérations du nombre d'ovulations, de la prolificité ou de la fertilité.

(Persani et al. 2014) Les variants en noir induisent une hyperprolificité à l'état hétérozygote, mais une stérilité à l'état homozygote en raison d'un blocage de la folliculogenèse aux premières étapes. Les variants en rouge augmentent le nombre d'ovulations de manière dose-dépendante en fonction du nombre de copie de l'allèle muté. L'impact fonctionnel prédit par la nature de la variation ou par les études in vitro est également rapporté. Les positions des acides aminés sont données par rapport au GDF9 ovine (NP\_001136360). SP : signal peptidique.

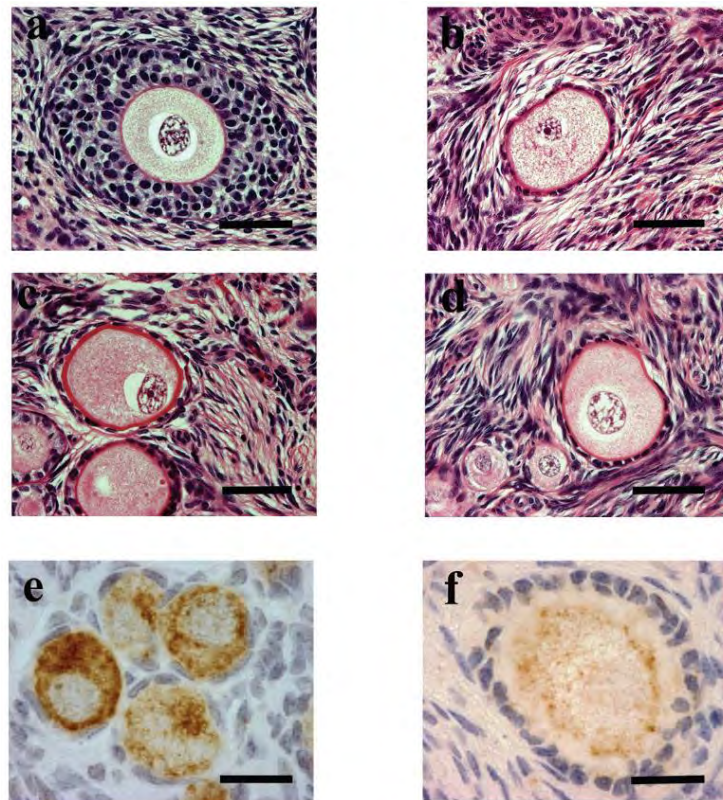


Figure 33: Coupes immunohistologiques de follicules en croissance basale dans des ovaires de brebis sauvages ou porteuses de mutations dans BMP15 ou GDF9.

(McNatty et al. 2005) Coupe histologiques d'ovaires montrant (a) follicule préantral « sauvage » ; (b) follicule primaire  $FecX^I/FecX^I$  ; (c) follicules primaires  $FecX^B/FecX^B$  ; (d) follicule primaires et primordiales  $FecG^H/FecG^H$ . Coupes immunohistologiques anti-GDF9 (e) ou anti-BMP15 (f) d'ovaires de brebis de type sauvage. Barres d'échelle a-d = 70  $\mu\text{m}$  ; e-h = 25  $\mu\text{m}$ .

En conclusion, les phénotypes *FecX/BMP15* mutés mettent en évidence le rôle crucial de *BMP15* dans le développement des follicules du stade primaire au secondaire (Otsuka and Shimasaki, 2002), la différenciation des follicules à antrum (Montgomery et al., 1992) et dans la sélection des follicules ovulatoires.

### 3) *FecG* / *GDF9*

Les cinq mutations *FecG* identifiées dans *GDF9* sont localisées dans la région mature de la protéine et entraînent toutes un changement d'acide aminé (Figure 32). Comme pour les mutations dans *BMP15*, certaines mutations dans *GDF9* sont responsables de la stérilité des brebis homozygotes mutantes, *FecG<sup>H</sup>*, *T* et *V* alors que d'autres entraînent des prolificités encore plus élevées qu'à l'état hétérozygote comme c'est le cas pour *FecG<sup>E</sup>* et *FecG<sup>NW</sup>*.

Au niveau ovarien, les brebis homozygotes stériles Belclare *FecG<sup>H</sup>/FecG<sup>H</sup>* (McNatty et al., 2005), Icelandic *FecG<sup>T</sup>/FecG<sup>T</sup>* (Nicol et al., 2009) et Île-de-France brésilienne *FecG<sup>V</sup>/FecG<sup>V</sup>* (Souza et al., 2014) présentent une hypoplasie ovarienne qui se caractérise par un développement folliculaire altéré, arrêté à un stade de follicule secondaire (2 à 4 couches de cellules de granulosa pour *FecG<sup>T</sup>*), ou qui peut se poursuivre, dans quelques rares cas, jusqu'au stade de formation de l'antrum (*FecG<sup>H</sup>*) (Hanrahan et al., 2004; Otsuka et al., 2001; Figure 33). Chez les brebis Icelandic homozygotes stériles *FecG<sup>T</sup>/FecG<sup>T</sup>*, les conséquences endocriniennes sont similaires à celles observées chez les brebis homozygotes mutées *FecX*. Les niveaux d'œstradiol et d'Inhibine très bas se répercutent au niveau hypophysaire par des niveaux circulants de FSH et de LH anormalement élevés (Nicol et al., 2009). Ces observations indiquent que *GDF9*, comme *BMP15* mais plus tardivement, est essentiel à la croissance folliculaire chez la brebis et que les mutations *FecG<sup>H</sup>*, *FecG<sup>T</sup>* et *FecG<sup>V</sup>* sont certainement de type « perte de fonction ».

La mutation *FecG<sup>E</sup>* quant à elle ne semble pas influencer le nombre total de follicules dans l'ovaire. Cependant, les brebis *FecG<sup>E</sup>/FecG<sup>E</sup>* et *FecG<sup>E</sup>/FecG<sup>+</sup>* présentent une proportion plus élevée de follicules primordiaux et de follicules transitoires. Les follicules ovulatoires sont également plus petits chez les homozygotes mutantes. Cependant, le nombre plus élevé de follicules ovulés par les brebis *FecG<sup>E</sup>/FecG<sup>E</sup>* n'est pas dû au recrutement d'un plus grand nombre de follicules (Chaves et al., 2019).

À l'échelle cellulaire, *GDF9* est également un facteur d'expression essentiellement ovocytaire (Bodensteiner et al., 1999; McGrath et al., 1995). L'utilisation de *GDF9* recombinante sur des tissus ovariens *in vitro* montre une progression des follicules primaires et une stimulation des follicules pré-antraux (Hayashi et al., 1999; Nilsson and Skinner, 2002; Hreinsson et al., 2002).



Sur les cellules de granulosa *in vitro*, GDF9 a comme *BMP15*, un rôle activateur de la prolifération cellulaire (McNatty et al., 2005a; Vitt et al., 2000a), un rôle inhibiteur sur la synthèse des récepteurs à LH (Elvin et al., 1999) et sur les effets positifs de la FSH sur la synthèse de progestérone et d'œstradiol (Fabre et al., 2006; Vitt et al., 2002). Dans le dialogue ovocyte-granulosa, contrairement à *BMP15*, GDF9 inhibe l'expression de Kit Ligand (Elvin et al., 1999). Dans les stades finaux de la croissance folliculaire, avant le pic de LH et l'ovulation, les cellules du cumulus ont besoin de GDF9 pour soutenir les cascades métaboliques telles que la glycolyse et la biosynthèse des stérols (Sugiura et al., 2005). Enfin, GDF9 induit également l'expansion du cumulus (Elvin et al., 1999; Gui and Joyce, 2005).

Ainsi, *GDF9*, à l'image de *BMP15*, joue donc un rôle important sur la stimulation de la prolifération des cellules de la granulosa et représenterait également un frein à la maturation folliculaire. En conclusion, les phénotypes *FecG/GDF9* mutés mettent en évidence le rôle crucial de *GDF9* dans le développement des follicules à des stades précoces (Otsuka et al., 2011).

#### 4) Modèles de contrôle du nombre d'ovulations par les BMPs chez la brebis

##### a) Le modèle physiologique

Les mutations de prolificité identifiées chez la brebis ont mis en lumière trois principaux gènes du système de signalisation des BMPs, *BMP15*, *GDF9* et *BMPR1B*. Les données obtenues des études physiologiques et fonctionnelles mènent à deux conclusions communes sur le rôle de ces 3 gènes *Fec*:

- ils agissent en stimulant la prolifération des cellules de granulosa dès les premiers stades de la croissance folliculaire et inhibent ensuite la maturation des follicules au cours des stades plus tardifs dépendants des hormones gonadotropes,

- l'augmentation de la prolificité est liée à une perte de fonction de ces gènes, qui se fait soit par une diminution des niveaux de protéines actives, soit par une altération de la liaison probable entre les ligands et les récepteurs au niveau des cellules de granulosa et des cellules du cumulus. Des expériences d'immunisation passive et active contre *BMP15* et/ou *GDF9* ont permis de valider cette notion de perte de fonction puisqu'elles provoquent soit une stérilité (caractérisée par des comportements d'œstrus anormaux, et un développement folliculaire altéré ou un arrêt de ce développement), soit une hyperprolificité (via l'augmentation du taux d'ovulation) de façon dose

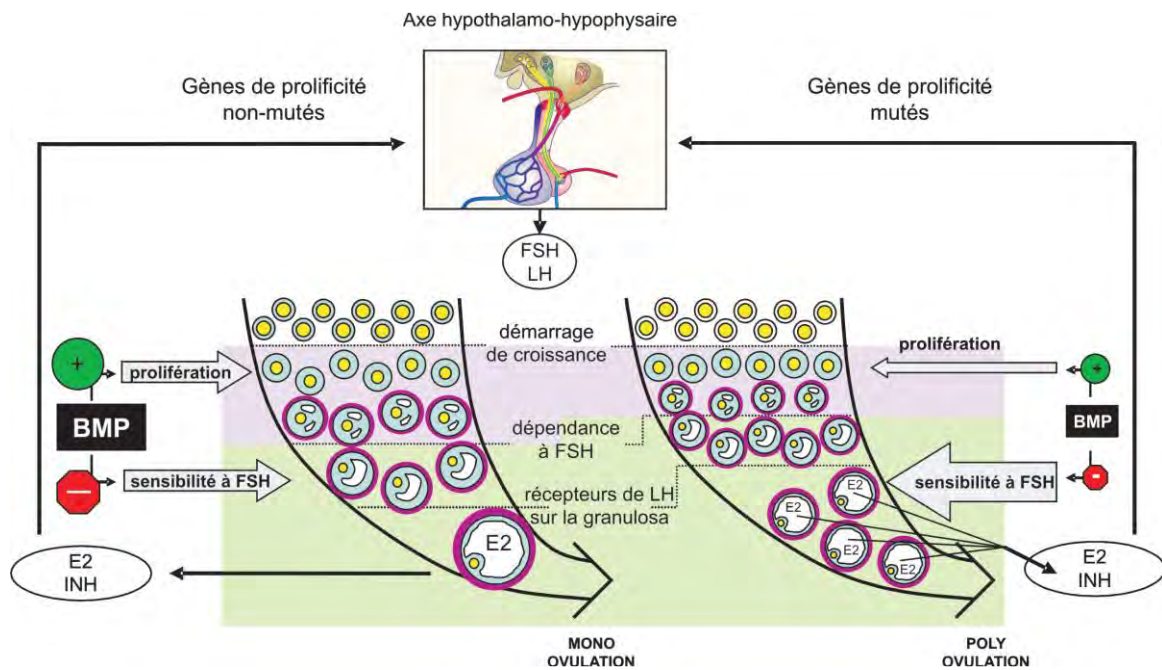


Figure 34: Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation et conséquences des mutations des gènes de proliférite sur la folliculogénèse et le nombre d'ovulations chez la brebis.

(Monniaux et al. 2009) L'activité réduite du système de signalisation des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) chez les brebis porteuses de mutations dans les gènes de proliférite BMP15, GDF9 ou BMPR1B, conduit à diminuer l'action des BMPs, d'une part sur la proliférite et d'autre part sur la sensibilité à FSH des cellules de la granulosa. Ainsi, les follicules antraux sont de plus petite taille avec moins de cellules de la granulosa, mais présentent une sensibilité accrue à FSH. Ceci permet d'avancer la maturation des follicules. Ces follicules plus petits produisent moins d'oestradiol et d'inhibine, mais ensemble, ils en produisent autant que le follicule pré ovulatoire des brebis non-mutées. En conséquence, il s'établit le même dialogue endocrinien entre l'ovaire et l'axe hypothalamo-hypophysaire dans les deux génotypes. Finalement, cette régulation aboutit à la sélection et à l'ovulation de plusieurs follicules de plus petite taille chez les brebis porteuses des mutations dans les gènes de proliférite.

E2= Oestradiol, INH= inhibine.

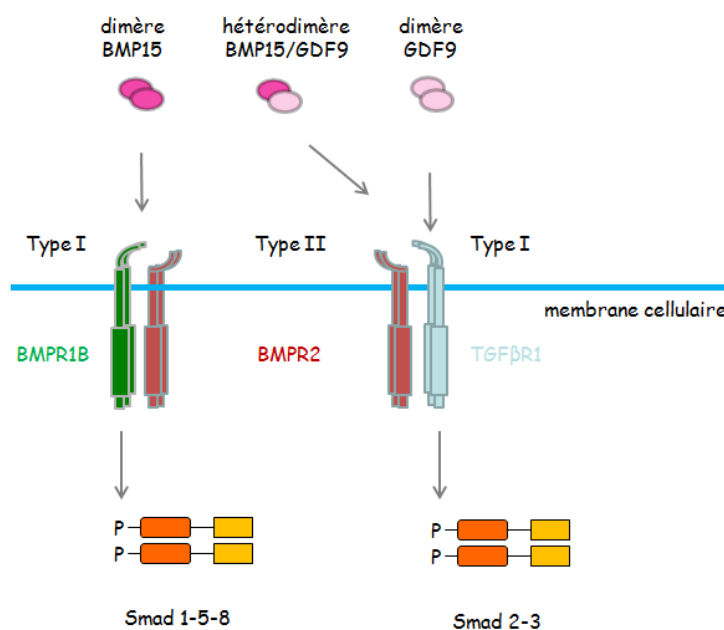


Figure 35: Relations fonctionnelles entre BMP15, GDF9 et BMPR1B.



dépendante, reproduisant ainsi les effets des mutations (Juengel et al., 2002, 2004; McNatty et al., 2007).

Sur cette base, Fabre et al. (2006) ont proposé un schéma explicatif des variations du nombre d'ovulations observées sous l'influence des mutations dans les gènes *Fec* (Figure 34). Dans le cas d'ovaires mutés pour un gène *Fec*, l'activité de signalisation du système BMP est réduite. Les conséquences en sont une diminution de l'action positive des BMP sur la prolifération des cellules de la granulosa et une levée de leur action inhibitrice sur la sensibilité à la FSH. L'ovaire présente ainsi de plus petits follicules à antrum avec un nombre réduit de cellules de la granulosa qui ont une sensibilité plus élevée aux gonadotropines. La maturation folliculaire est avancée comme en atteste l'expression plus précoce des récepteurs à LH. Au cours de la maturation dépendante de la FSH, ces plus petits follicules vont produire individuellement des quantités réduites d'œstradiol et d'inhibine, mais ensemble, ils en produisent autant que le follicule pré-ovulatoire de brebis non mutées. In fine, le dialogue endocrinien entre l'ovaire et l'axe hypothalamo-hypophysaire reste le même entre les deux génotypes et la maturité précoce des follicules chez les brebis porteuses d'un gène *Fec* entraîne la sélection puis l'ovulation de follicules plus petits, mais surtout plus nombreux. Plus récemment, il a été proposé que la perte d'action des BMPs serait amplifiée par une perte concomitante d'action de l'AMH, utilisant la même voie de signalisation, les brebis mutées dans *BMPRI1B* ayant moins d'AMH (Estienne et al., 2015) et les brebis mutées dans *BMP15* exprimant moins de récepteur *AMHR2* (Pierre et al., 2016).

#### b) Le modèle moléculaire

A l'échelle moléculaire, comme indiqué précédemment, ces trois gènes *BMP15*, *GDF9* et *BMPRI1B* appartiennent au même système de signalisation. *BMP15* (*FecX*) et *GDF9* (*FecG*) ont la capacité de former des hétérodimères et ainsi coopérer pour agir sur les cellules de granulosa (Figure 35) (Edwards et al., 2008; Liao et al., 2003; Reader et al., 2011). De façon intéressante, la co-expression de la forme mutante *FecX<sup>B</sup>* de *BMP15* et de *GDF9* de type sauvage réduit significativement la sécrétion de ces deux facteurs, ce qui suggère que le mécanisme par lequel les mutations de *BMP15* affectent la prolificité des ovins pourrait également impliquer *GDF9* (Liao et al., 2003, 2004). Cette synergie d'action est d'autant plus marquée par le fait qu'à la fois les homodimères *BMP15* et *GDF9* et les hétérodimères *GDF9/BMP15* utilisent les mêmes récepteurs de type 2 *BMPRI1B* (Edwards et al., 2008; Liao et al., 2003; Mazerbourg et al., 2004), alors que les récepteurs de type 1 sont différents pour ces deux facteurs. *BMP15* se lie avec une grande affinité au récepteur *BMPRI1B* (*FecB*) (Moore et al., 2003) alors que l'homodimère *GDF9* et l'hétérodimère



BMP15/GDF9 utiliserait le récepteur de type 1 du TGF $\beta$ , TGFBR1 (ALK5) insaisissant une signalisation via les SMAD2/3 (Juengel et al., 2004; Mazerbourg et al., 2004; Peng et al., 2013b).

Nombre de ces résultats ont été acquis *in vitro* en utilisant des protéines recombinantes. *In vivo*, il apparaîtrait que ni les homodimères, ni les hétérodimères BMP15:GDF9 puissent se former chez les ovins et les bovins (Heath et al. 2017). La synergie fonctionnelle pourtant observée entre ces deux ligands s'expliquerait par une liaison de leur forme non clivée à un complexe de récepteurs associant BMPR2 (commun au deux ligands) et BMPR1B pour BMP15 et TGFBR1 pour GDF9.

Quoiqu'il en soit, l'appartenance de ces 3 gènes *Fec* à un même système de signalisation est en partie confirmée *in vivo*. Les modèles de souris double KO *BMP15/GDF9* ont donné la première preuve d'un effet biologique de la coopération entre ces deux facteurs dérivés des ovocytes (Yan et al., 2001). Par ailleurs, les travaux de Davis et al, ont montré que les brebis porteuses de mutations à la fois dans *BMP15* et *BMPR1B* avaient un taux d'ovulation bien supérieur à celui des brebis mutées *BMPR1B* ou hétérozygotes mutées *BMP15*. Cette observation met donc en évidence une interaction de BMP15 avec BMPR1B. Ce plus fort taux d'ovulation ne s'apparentant pas à un effet additif des deux mutations, les auteurs en ont donc conclu un effet épistatique des deux locus (Davis et al., 1999) (Davis et al., 1999). En race Cambridge et Belcare, les brebis doubles hétérozygotes mutées *FecX<sup>B</sup>/BMP15<sup>S367I</sup>* (ou *FecX<sup>G</sup>/BMP15<sup>Q239X</sup>*) et *FecG<sup>H</sup>/GDF9<sup>S395F</sup>* présentent un taux d'ovulation supérieur à celui des hétérozygotes mutées pour l'un ou l'autre des deux gènes (Hanrahan et al., 2004). L'effet des mutations à l'état hétérozygote est ainsi additif. Cette observation soutiendrait donc le fait que les effets de *BMP15* et *GDF9* sur la fonction ovarienne seraient distincts (Shimasaki et al., 2003).

Sur la base des connaissances fonctionnelles et des phénotypes pour toutes les mutations connues, Demars *et al.* proposent, en 2013, un modèle du contrôle du nombre d'ovulations à l'échelle moléculaire. Dans ce modèle, ce nombre semble être rigoureusement contrôlé par la triple activité de 1) l'homodimère BMP15 et sa signalisation via BMPR1B/BMPR2/SMAD1,5,8 (Moore et al., 2003), 2) l'hétérodimère ou la synergie BMP15/GDF9 et sa signalisation via TGFBR1/BMPR2/SMAD2,3 (Reader et al., 2011), et 3) l'homodimère GDF9 et sa signalisation via TGFBR1/BMPR2/SMAD2,3 (Figure 36). Le fonctionnement équilibré de ces 3 voies établit le niveau « normal » de la signalisation BMP dont la conséquence est la mono-ovulation. L'altération d'au moins une de ces trois voies est à l'origine d'une réduction du niveau global d'activité et les conséquences en sont soit une anovulation (stérilité), soit une poly-ovulation (hyperprolificité) (Figure 36).



En dessous d'un seuil critique, l'altération du système BMP15/GDF9/BMPR1B bloque précocement la folliculogenèse et conduit à un phénotype stérile. C'est ce qui est observé sous l'effet des mutations *FecX<sup>L, H, G, R</sup>*. L'absence de production de BMP15 biologiquement actif réduit notablement les voies de signalisation passant par l'homodimère BMP15 et l'hétérodimère BMP15/GDF9. Pour les mutations *FecG<sup>H</sup>* et *FecG<sup>T</sup>*, l'hypothèse est faite qu'une perte de fonction de *GDF9* (qui reste à démontrer) puisse altérer à la fois les voies de signalisation des homodimères GDF9 et des hétérodimères GDF9/BMP15.

Entre le seuil critique de stérilité et l'activité globale dite normale, le taux d'ovulation et la taille de portée sont augmentés selon le modèle physiologique précédent. Dans ce cas, les mutations *Fec* altèrent soit entièrement les voies de signalisation des homodimères BMP15 ou GDF9, soit partiellement les voies des homodimères et des hétérodimères BMP15/GDF9 (Figure 36 B et C). Les brebis hétérozygotes sont donc hyperprolifiques et non pas stériles. Les mutations *FecX<sup>Gr</sup>*, *FecX<sup>O</sup>* et *FecG<sup>F</sup>* illustrent parfaitement cette situation (Figure 36 D). Cette hypothèse est aussi valable avec le phénotype homozygote hyperprolifique de la mutation *Booroola*. La perte de fonction affecte le récepteur BMPR1B suggérant ainsi que la voie de signalisation de l'homodimère BMP15 seule est affectée (Demars et al., 2013).

Tableau 4: Nom et fonction connue des protéines montrant une glycosylation atypique, présentes uniquement dans le liquide folliculaire ovarien de brebis homozygotes *Fccl*<sup>L</sup>.

Protéine	Sigle	Fonctions connues dans l'ovaire
Versican	VCAN	Protéines de la matrice extracellulaire impliquées dans de nombreux processus du développement folliculaire, tels que la formation de l'antrum, du liquide folliculaire et du gradient osmotique, l'expansion du cumulus, l'ovulation, la régulation des facteurs de croissance et le remaniement structural des follicules au cours de la folliculogénèse.
<i>Inter-<math>\alpha</math> trypsin inhibitor heavy chain H1</i>	ITIH1	
Facteur de coagulation	F5	Régulateurs de l'angiogénèse, la réponse immunitaire, la coagulation et la fibrinolyse. Certaines études ont notamment mis en évidence que les sérine-protéases et leurs inhibiteurs pouvaient moduler la maturation ovocytaire, l'ovulation ainsi que la production de facteurs paracrines et autocrines.
Inhibiteur de sérine protéase	SERPIN2	
Sulfotransférase	HS6ST2	
Clustérine	CLU	CLU est exprimée par les cellules de la granulosa des follicules atreétiques en particulier. Son rôle est de protéger les cellules de la granulosa de l'apoptose au cours de l'atréisie folliculaire. CLU est une protéine chaperonne capable de se lier à un certain nombre de protéines, dont le récepteur de surface LRP2. En fixant LRP2, CLU permet l'accumulation ou la dégradation des protéines chaperonnes et peut également participer à la distribution du cholestérol dans les cellules stéroïdogènes, et donc à la croissance folliculaire, comme le fait LRP8 dans les cellules de la granulosa bovines. Il n'est donc pas impossible que LRP1 puisse avoir cette même fonction dans la distribution du cholestérol chez l'ovine. Par ailleurs, LRP1 s'avère avoir une structure identique à celle du récepteur TGF $\beta$ R5, impliqué dans l'inhibition de la prolifération cellulaire induite notamment par les TGF $\beta$ , et participe de ce fait à sa régulation dans des cellules ovariennes.
<i>Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1</i>	LRP1	
Hémicentine	HMNCN1	Protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans le contact, l'adhésion et la migration cellulaire. Aucun rôle direct de HMNCN1 n'a été décrit dans la fonction ovarienne.
sous-unité $\alpha$ de l'inhibine	INHBA	Ces deux sous-unités conduisent à la formation de l'activine A (homodimère INHBA-INHBA) et de l'inhibine A (hétérodimère INHA-INHBA), membres de la superfamille des TGF $\beta$ . Elles sont produites par les cellules de la granulosa et sont accumulées à de fortes concentrations dans les liquides folliculaires du stade de petit follicule à antrum au stade préovulatoire. Les fonctions de l'activine et l'inhibine sont détaillées plus loin.
sous-unité $\beta$ A de l'inhibine	INHBA	

## D. Conséquences de la mutation *FecL/B4GALNT2* associée à l'hyperprolificité sur la fonction ovarienne

Nous avons vu précédemment que l'effet de la mutation autosomale *FecL* sur le taux d'ovulation était additif, puisqu'une copie augmente le taux d'ovulation d'environ 1,5 et deux copies d'environ 3,0. Cette augmentation du taux d'ovulation est associée à une augmentation du nombre de follicules à antrum (dépendants des gonadotropines) d'un diamètre supérieur à 3 mm ainsi qu'à une réduction de la taille des follicules préovulatoires, plus petits d'1 mm (Drouilhet et al., 2010). Cette réduction du diamètre des follicules ovulatoires est à rapprocher d'observations similaires pour les mutations dans *FecB* et *FecX* (Driancourt et al., 1985; Fabre et al., 2006; Montgomery et al., 1992, 2001). Mais, au niveau endocrinien, les brebis porteuses de *FecL* présentent des concentrations plasmatiques d'œstradiol plus élevées en phase folliculaire conduisant à une augmentation de la fréquence des pulses de LH et in fine à un pic pré-ovulatoire de LH plus précoce que les brebis non porteuses. En phase lutéale, les taux de progestérone sont également augmentés. Seule la concentration circulante de FSH reste inchangée entre les deux génotypes au cours du cycle. Ces profils endocriniens différents entre les génotypes pour une mutation de prolificité sont un phénotype qui n'avait pas été observé chez les brebis prolifiques brebis mutées dans *FecX/BMP15*, *FecG/GDF9* et *FecB/BMPRII* (Drouilhet et al., 2010).

La mutation *FecL*, identifiée comme un SNP en position intronique dans le gène *B4GALNT2* est associée à une sur expression de ce gène dans les cellules de la granulosa au niveau ovarien (Drouilhet et al., 2013). Ce gène code une enzyme de la glycosylation permettant le transfert d'un résidu N-acetylgalactosamine (GalNac) sur un galactose subterminal d'une chaîne sucrée. Contrairement aux autres gènes *Fec* identifiés dans l'espèce ovine, *B4GALNT2* n'appartient pas au système TGF $\beta$ /BMP. Cependant, les conséquences de la surexpression ovarienne de *B4GALNT2* seraient la glycosylation atypique par transfert de GalNac, sur des éléments de la matrice extracellulaire et sur les sous-unités de l'inhibine A, INHA et INHBA (Tableau 4).

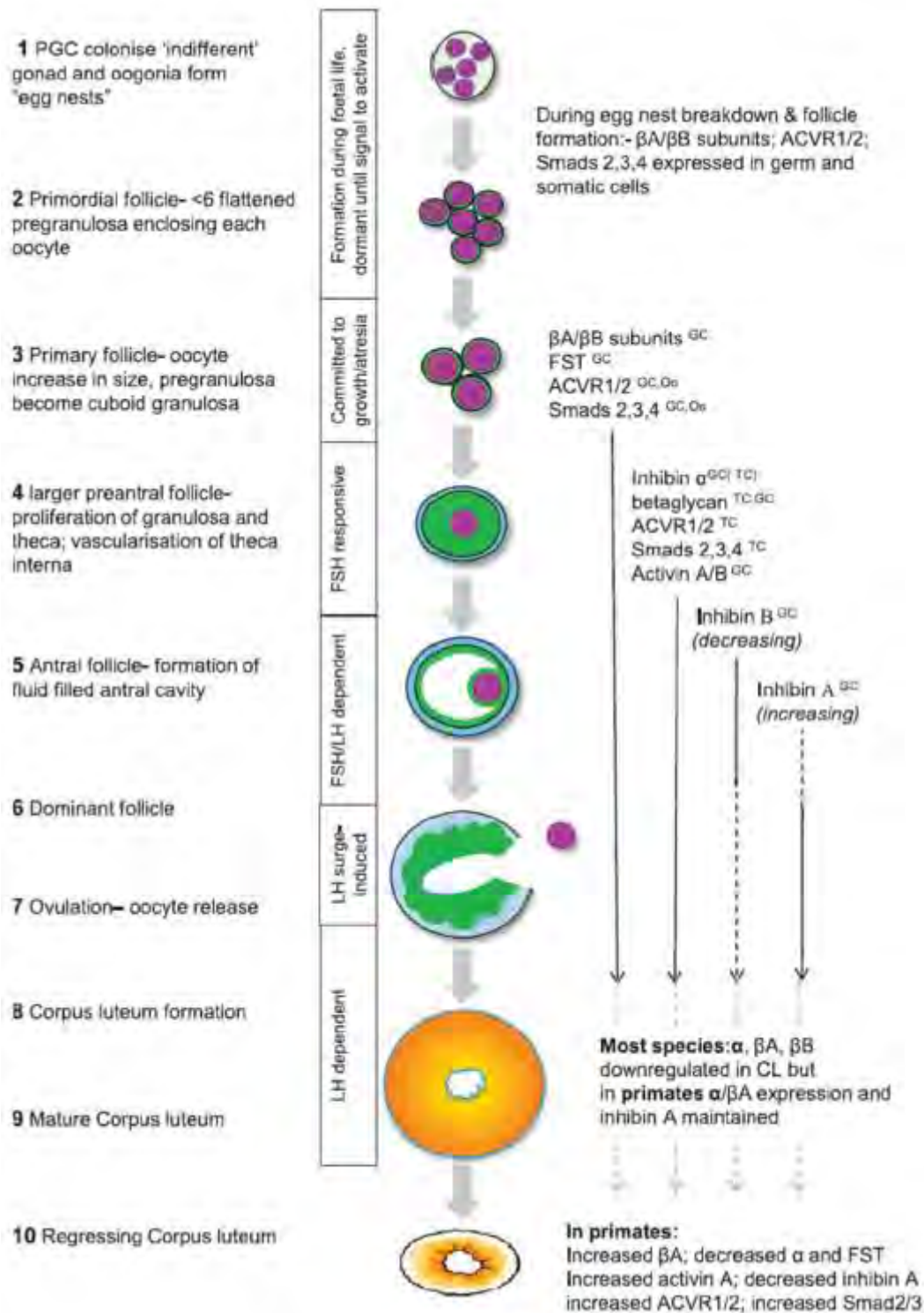


Figure 37: Expression des éléments du système inhibine/activine aux différents stades de développement des follicules et du corps jaune.

(Knight *et al.*, 2012). En exposant figurent les principaux types cellulaires (<sup>GC</sup> : granulosa, <sup>TC</sup> : thèque, <sup>Oo</sup> : ovocyte) dans lesquels sont exprimés les différents constituants de la voie de signalisation. Les flèches indiquent si l'expression se poursuit (ligne pleine) ou diminue (ligne en pointillés) au stadesuivant. CL : Corps jaune.



La surexpression de B4GALNT2 s'initiant au stade des follicules secondaires (Mansanet, 2013), l'altération de glycosylation des sous-unités de l'inhibine pourrait avoir lieu dès ce stade et continuer tout au long de la folliculogénèse jusqu'au stade préovulatoire (Figure 37). Les sous-unités INHA et INHBA de l'inhibine conduisent à la formation et à la production de l'Activine A et de l'Inhibine A (Knight et al., 2012). Ces deux sous-unités sont produites par les cellules de la granulosa et sont accumulées à de fortes concentrations dans les liquides folliculaires du stade de petit follicule à antrum au stade préovulatoire (Medan et al., 2007). L'Activine A est décrite comme agissant via une signalisation auto/paracrine dans les cellules de la granulosa et de la thèque (Knight et al., 2012), alors que l'inhibine A agit principalement par une régulation endocrine négative sur la sécrétion hypophysaire de FSH. Elle est connue également pour exercer une action inhibitrice de l'activine A et d'autres molécules BMPs par antagonisme au niveau de la liaison à leurs récepteurs altérant leur rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse et de la prolifération des cellules folliculaires (Knight et al., 2012; Wiater and Vale, 2003). De façon très intéressante, une immunisation contre l'inhibine est à l'origine d'une augmentation du taux d'ovulation et de la prolificité via la stimulation du développement folliculaire chez de nombreuses espèces de ruminants, dont la brebis (Campbell et al., 1995; Campbell and Scaramuzzi, 1995; Tannetta et al., 1998).

Si les résultats de la thèse de C. Mansanet (2013) n'avaient pas permis de montrer la conséquence fonctionnelle directe de la glycosylation atypique des sous-unités de l'inhibine sur leur activité, ils avaient pu montrer que les brebis homozygotes porteuses de *FecL<sup>L</sup>* présentaient des altérations des concentrations circulantes et folliculaires. En effet, si la concentration plasmatique d'activine A est similaire entre les deux génotypes, la concentration d'inhibine A est 3 fois plus faible dans la circulation des brebis homozygotes *FecL<sup>L</sup>* en comparaison des brebis non porteuses, alors que les concentrations folliculaires sont 2 fois plus élevées. Les hypothèses avancées étaient que la glycosylation atypique d'INHA et d'INHBA par B4GALNT2 puisse altérer l'hétéro-/homo-dimérisation des sous-unités et change le ratio inhibine A / activine A et/ou que l'inhibine A soit retenue à l'intérieur des follicules par des changements de la matrice extracellulaire elle-même glycosylée par l'activité de B4GALNT2. La même observation a été faite pour l'AMH qui n'avait pourtant pas été observée comme cible directe de la glycosylation par B4GALNT2 (Drouilhet et al., 2013; Mansanet, 2013). Malheureusement, toutes ces observations ne permettent pas pour l'instant de proposer un modèle cohérent du mécanisme de contrôle de la prolificité par la mutation *FecL<sup>L</sup>*; même si l'altération du fonctionnement des membres de la famille du TGFβ semble toujours être au cœur du phénomène.

Tableau 5: Gènes majeurs de prolificité et leurs mutations chez les ovins

Gène (chromosome)	Allèle	Mutation	Race	Effet : taux d'ovulation (TO) la taille de portée (TP)	Références
<i>BMPR1B</i> (OAR6)	<i>FecB<sup>B</sup></i>	c.746A>C Q249R	Booroola Merino Javanese Small Tailed Han Hu Garole Kendrapada	B/+ : TO +1,5 ; TP +1,0 B/B : TO +3,0 ; TP +1,5	Souza et al. 2001 Mulsant et al. 2001 Wilson et al. 2001 Davis et al. 2006 Chu, Liu et al. 2007 Fogarty et al. 2009
<i>BMP15</i> (OARX)	<i>FecX<sup>Bar</sup></i>	c.302_304delCTA	Barbarine	Bar/+ : TO +0,7; TP +0,3 Bar/Bar : stérile	Lassoued et al. (2008)
	<i>FecX<sup>R</sup></i>	c.525_541del W154NfsX55	Rasa Aragonesa	R/+ : TP +1,3 R/R : stérile	Martinez-Royo et al (2008)
	<i>FecX<sup>G</sup></i>	c.718C>T Q239X	Belclare Cambridge	G/+ : TO +0,7 G/G : stérile	Hanrahan et al (2004)
	<i>FecX<sup>H</sup></i>	c.871C>T Q291X	Romney (Hanna)	H/+ : TO +1,0 ; TP +0,6 H/H : stérile	Davis (2005)
	<i>FecX<sup>I</sup></i>	c.896T>A V299D	Romney (Inverdale)	I/+ : TO +1,0 ; TP +0,6 I/I : stérile	Davis (2005)
	<i>FecX<sup>Gr</sup></i>	c.950C>T T317I	Grivette	Gr/+ : TO +0,5 ; TP +0,1 Gr/Gr : TO +2 ; TP +0,7	Demars et al. (2013)
	<i>FecX<sup>L</sup></i>	c.962G>A C321Y	Lacaune	L/+ : TO +2 L/L : stérile	Bodin et al. (2007)
	<i>FecX<sup>O</sup></i>	c.1009A>C N337H	Olkuska	O/+ : TO +1; TP +0,6 O/O : TO +1,6 ; TP +1,2	Demars et al. (2013)
	<i>FecX<sup>B</sup></i>	c.1100G>T S367I	Belclare	B/+ : TO +1,0 B/B : stérile	Hanrahan et al (2004)
<i>GDF9</i> (OAR5)	<i>FecG<sup>V</sup></i>	c.943C> T R315C	Ile de France du Brésil (Vacaria)	V/+ : TO +1,1 ; TP 0,32 V/V : Stérile	Souza et al. 2014
	<i>FecG<sup>E</sup></i>	c.1034T>G F345C	Santa ines (Embrapa)	E/+ : TP +0,3 E/E : TO +1; TP +0,7	Silva et al. (2011)
	<i>FecG<sup>NW</sup></i>	c.1111G>A V371M	White Norwegian	WN/+ : TP +0,2 WN/WN : TP +0,5	Vage et al. (2013)
	<i>FecG<sup>H</sup></i>	c.1184C>T S395F	Belclare (High Fertility)	H/+ : TO +1,4 H/H : stérile	Hanrahan et al (2004)
	<i>FecI<sup>T</sup></i>	c.1279A>C S427R	Icelandic (Thoka)	I/+ : TO +1,2 ; TP +0,64 I/I : stérile	Nicol et al. (2009)
<i>B4GALNT2</i> (OAR11)	<i>FecL<sup>L</sup></i>	g.36938224T>A	Lacaune	L/+ : TO +1,5 L/L : TO +3	Drouilhet, Mansanet et al. (2013)
	<i>FecX2<sup>W</sup></i>		Woodland	W/+ : TO +0,4 ; TP +0,25 W/W : TO & TP ≥ W+	Davis et al. (2005)
	<i>FecW</i>		Whishart	W/+ : TO +0,8, + 1 W/W : non établi	
<i>LEPR</i> (OAR1)		g.40787726 C>T g.40857869 C>T g.40858019 A>G	Davisale	m/m : +17 jours pour la puberté ; TO : -15%	Haldar et al. 2014

# Situation du sujet et Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu tout au long de la partie introductive, quatre gènes majeurs de prolificité ont déjà été identifiés chez les ovins (*BMPR1B*, *BMP15*, *GDF9* et *B4GALNT2*) en particulier par l'équipe d'accueil de cette thèse. Depuis la découverte par une approche familiale du premier gène majeur associé à une augmentation de la prolificité, *FecB/BMPR1B*, les avancées sur la connaissance du génome ovin, la disponibilité d'outils génomiques comme les puces de génotypage SNP à haut-débit (basse densité 15k, moyenne densité 50k et haute densité 600k) et le séquençage complet des génomes pour moins de 1000€, permettent de faire passer le délai d'identification de ces mutations de 20 ans à quelques mois. Ceci a eu pour conséquence de permettre l'identification de 16 mutations différentes dans ces 4 gènes *Fec* (Tableau 5).

Dans le contexte actuel de diminution du cheptel ovin et d'érosion de la production d'agneaux, il est important de contrecarrer la baisse de productivité estimée à 1% par an depuis 2000. La productivité numérique directement en lien avec la prolificité semble être un des indicateurs de productivité le plus altéré, d'où l'importance de travailler sur la maîtrise de ce caractère. La gestion et la diffusion de ces mutations à effet majeur affectant la prolificité est un des leviers permettant de contrôler ce caractère. Ainsi les travaux de recherches ont permis de fournir des outils génétiques (marqueurs moléculaires) pour repérer les animaux porteurs et commencer la gestion raisonnée du caractère prolificité dans les populations d'intérêts en comparant des scénarii issus de modélisations (Raoul, 2017). Ce travail est assez avancé en France en population Lacaune allaitante (schéma de sélection OVI-TEST) pour la mutation *FecL<sup>L</sup>* dans *B4GALNT2* pour laquelle la préconisation est d'avoir dans les troupeaux en sélection, 50% de brebis non porteuses et 50% de brebis hétérozygotes, les homozygotes n'étant pas souhaitables pour leur prolificité trop importante (Martin et al., 2014). À l'inverse, ce type de sélection assistée par marqueur ne fait que commencer en population Grivette avec la découverte de la mutation prolifique *FecX<sup>Gr</sup>* dans *BMP15* (Demars et al., 2013).

Cependant, comme nous avons pu le voir précédemment, l'hypothèse est posée de la ségrégation d'autres mutations de prolificité dans différentes populations ovines. La recherche de telles mutations constitue une opportunité supplémentaire de gestion efficace des populations, mais aussi de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle de la fonction ovarienne, et/ou de confirmer deux observations qui ont émergé ces dernières années,

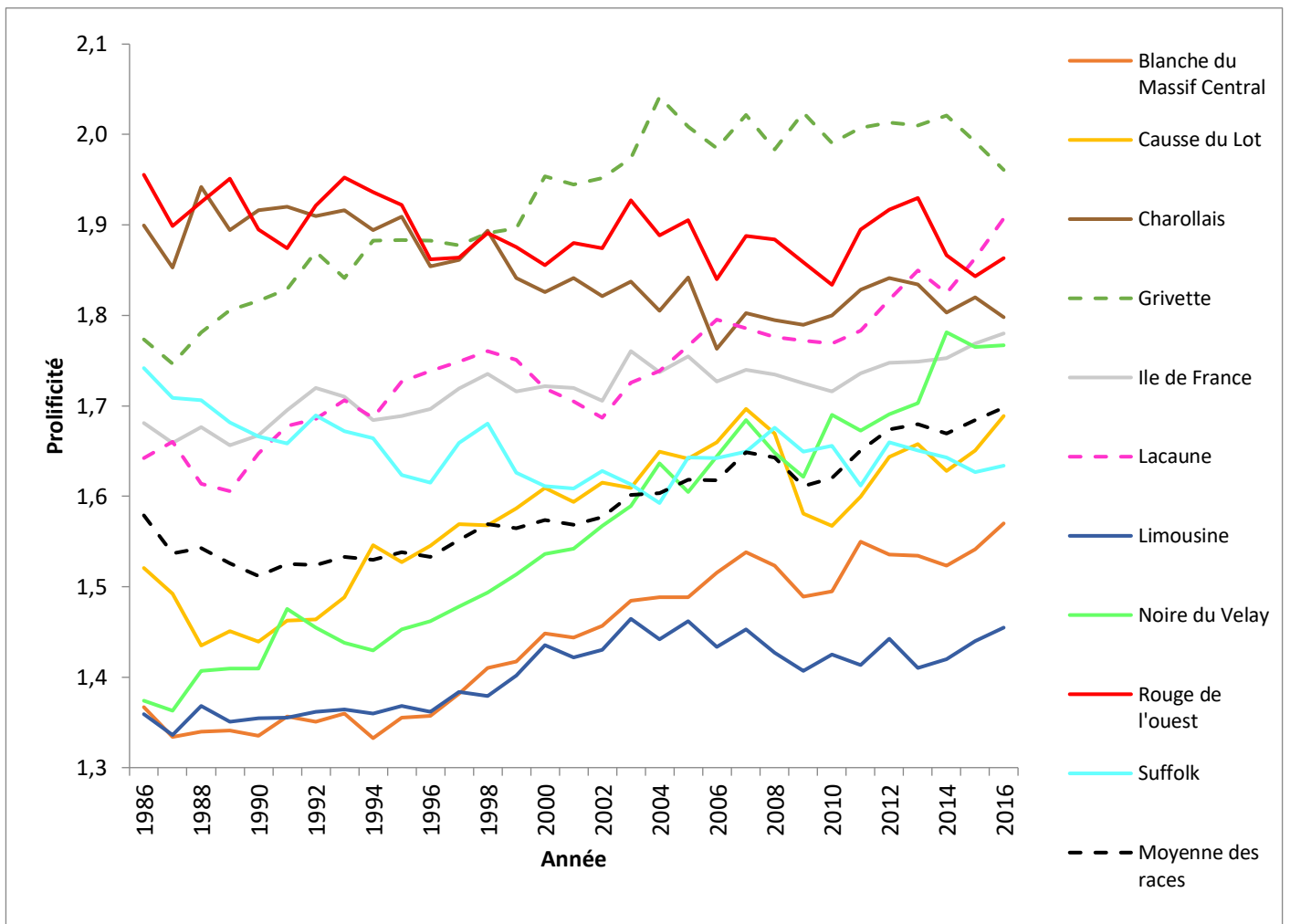


Figure 38: Évolution de la prolificité d'un ensemble de race ovines françaises entre 1986 et 2016 d'après les données de la base OVALL.

Données de prolificité sur oestrus naturel issues de la base nationale OVALL depuis 1986 à partir des tailles de portée de femelles adultes ayant eu au moins 3 mises bas.

Moyenne des races : Charollais, Mouton Vendéen, Rouge de l'ouest, Suffolk, Merinos, Romane, Tarasconnaise, Texel, Prealpes, Limousine, Ile de France, Bizet, Est à Laine, Lacaune (Gebro et Ovitest), Grivette, Causse du Lot, Rava, Blanche du Massif Central et Noire du Velay.

la possibilité de ségrégation de plusieurs mutations de prolificité dans la même population (*FecX<sup>B</sup>* et *FecG<sup>H</sup>* en Belclare, *FecX<sup>L</sup>* et *FecL<sup>L</sup>* en Lacaune) ou d'une même mutation dans des populations différentes (*FecB<sup>B</sup>* en Mérinos, Garole et Javanese).

En France, l'organisation de la filière ovine allaitante permet le recueil et l'enregistrement de données dans le système d'information génétique ovins allaitants OVAL. Cette base de données informatisée a pour fonction de 1) collecter des informations du contrôle de performance des ovins allaitants et de les centraliser et 2) permettre aux organismes ayant mission de gérer ce contrôle d'apporter à leurs adhérents des conseils techniques à l'aide de différents modules techniques de type valorisation et bilans. En particulier, un bilan est réalisé tous les ans par l'institut de l'élevage (<http://idele.fr/>).

La base de données regroupe de nombreuses informations telles que les documents officiels (inventaires agneau, brebis, béliers, pédigrée...), la base agnelage, la base lutte, etc. Dans le cadre de la recherche de gènes majeurs de prolificité, cette base de données permet d'identifier les mises bas sur œstrus naturel ou induit, de calculer la prolificité et la fertilité de toutes les races françaises au contrôle de performance. Elle rassemble un peu plus de 12 millions d'agnelages depuis 1986. À titre d'exemple, pour la campagne 2017, 315 560 brebis (soit 7,74 % du cheptel femelle ovine allaitant national) ont été contrôlées dans 1 187 élevages (pour 1 217 troupeaux), représentant 45 races. En plus d'information de pédigrée, les principales performances enregistrées sont : le nombre de brebis agnelées, leur prolificité (sur œstrus naturel ou induit par la PMSG), le nombre moyen de mise-bas par brebis, et les poids à âge type à 30 et 70 jours (PAT30, PAT70) pour les agneaux mâles.

C'est en analysant les données de prolificité sur œstrus naturel, leur variabilité entre animaux, leur répétabilité à chaque mise-bas et en tenant compte des informations de pédigrée, que des hypothèses de ségrégation de gènes majeurs de prolificité ont pu être avancées pour certaines populations alimentant les objectifs de cette thèse. C'est notamment le cas des races Noire du Velay, Blanche du Massif Central, Rava ou encore Causse du Lot (Causse du Lot), dont les évolutions de performance de prolificité sur les 30 dernières années suivent celles des populations Lacaune et Grivette pour lesquelles des mutations à effet majeur sur la prolificité ont été identifiées (Figure 38), au contraire d'autres races dont la prolificité n'a pas évolué aussi fortement voir diminué comme la Suffolk, la Limousine ou encore la Charollaise (Figure 38).

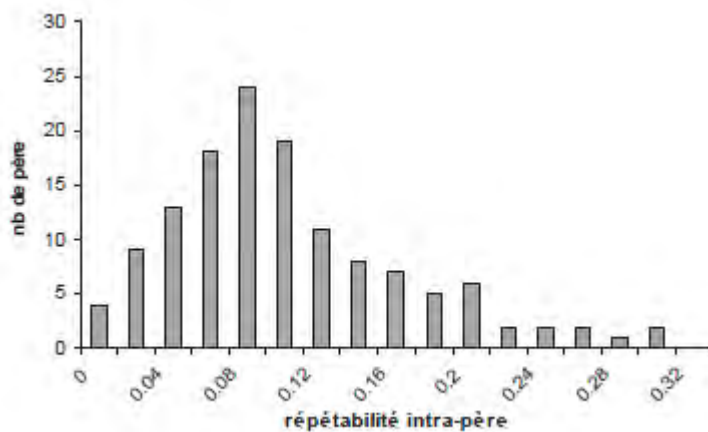


Figure 39: Distribution de la répétabilité des performances de prolificité intra-père en race Ile de France.

Représentation de la répétabilité des performances de 139 mâles Ile de France ayant au moins 25 filles avec plus de 4 mises bas.

Tableau 6 : Extraction de données de prolificité de la base OVALL pour des brebis Lacaune non porteuses des mutations  $FecX^L$  et  $FecL^L$ .

Identification animal	Identification cheptel	Année naissance	Date mise-bas	Prolificité				
					1	2	3	4
16138872160	12105263	2016	03/03/2019	4,00	3	5	.	.
16138862155	12105263	2015	22/11/2018	3,66	3	3	5	.
55066060406	81082080	2015	21/11/2018	3,66	3	2	5	.
55197760407	81266101	2015	27/08/2018	3,50	3	4	2	5
16012461247	12201260	2015	15/01/2019	3,00	2	2	5	.
55197760468	81266101	2015	04/12/2018	3,00	2	4	1	5
55197760392	81266101	2015	01/04/2018	3,00	3	1	5	.
16138850497	12105263	2014	20/09/2018	2,50	1	2	5	2
55000152104	81266191	2014	21/03/2017	2,33	1	1	5	.

En race Ile-de-France, la répétabilité des performances de prolificité d'un ensemble de filles pour un père donné est en moyenne de 0,10. Cependant, dans cette population, la distribution de cette répétabilité montre des valeurs bien plus élevées de l'ordre de 0,30 pour certains béliers (Bodin et al., 2011 ; Figure 39), laissant envisager la ségrégation d'une mutation à effet majeur sur la prolificité. La découverte de la mutation *FecG<sup>V</sup>* dans *GDF9* en 2014 dans une population Ile-de-France au Brésil est venue confirmer cette hypothèse (Souza et al., 2014). Cependant, des travaux préliminaires à cette thèse de génotypage de *FecG<sup>V</sup>*, n'ont pas permis de retrouver celle-ci dans la population française.

Malgré la découverte de deux mutations à effet majeur sur la prolificité en race Lacaune du schéma de sélection de l'entreprise OVITEST, une partie de ce phénotype reste inexpliquée. Depuis 2008, la mutation *FecX<sup>L</sup>* dans *BMP15* est contre sélectionnée (créant de la stérilité à l'état homozygote) au profit de la gestion de *FecL<sup>L</sup>* menant au génotypage de toutes les agnelles de renouvellement pour cette mutation. Cependant des tailles de portée importantes et répétées ( $\geq 3$ ) voir extrêmes ( $\geq 5$  ; Tableau 6) sont encore enregistrées parmi des brebis non porteuses des deux mutations, laissant là encore penser à l'effet d'une troisième mutation.

Enfin à titre de dernier exemple, il y a une vingtaine d'année, des tailles de portée élevées (moyenne de 2,23) associées à des nombres d'ovulations moyens de 2,54 par brebis ont été observés dans la race Belle-Île. Le mode de ségrégation de ces phénotypes a amené à émettre l'hypothèse de la ségrégation d'un gène majeur autosomal dans cette population qui reste à découvrir (Malher and Le Chère, 1998). Cette race aussi appelée « Race de deux » (2 agneaux nés en moyenne par mise-bas) est classée comme une race en danger (environ 200 brebis au total) et maintenue dans de petits troupeaux, qui ne sont pas en contrôle de performance.

Du point de vue des connaissances fondamentales, ces travaux alliant systématiquement déterminisme génétique et déterminisme physiologique et fonctionnel des mutations prolifiques ont permis de faire avancer largement les connaissances sur la fonction ovarienne (Bodin et al., 2007; Demars et al., 2013; Drouilhet et al., 2009, 2010, 2013; Estienne et al., 2015; Fabre et al., 2003; Mulsant et al., 2001). Mais si l'effet de ces gènes et de leurs mutations sur la régulation du nombre d'ovulations est évident, il est également important de connaître les effets connexes sur d'autres paramètres comme l'âge à la puberté, la fertilité naturelle ou après Insémination Animale (IA), la saisonnalité de la reproduction ou encore la mortalité et la croissance des agneaux. Dans le cadre d'une reproduction assistée par l'utilisation de traitements hormonaux pour la synchronisation des cycles (principalement des éponges intra vaginales imprégnées de





progestagène et des injections de gonadotropines du type PMSG), une bonne gestion des brebis naturellement prolifiques porteuses des mutations à effet majeur sur l'ovulation pourrait permettre de réduire le recours à ces traitements. À cet égard, une proposition de résolution du parlement européen (PE 589.295v02-00; A8-0014/2017) dans son point 43 indique sa préoccupation de l'importation et l'utilisation de médicaments vétérinaires contenant de la gonadotrophine extraite du sérum de jument gravide (PMSG). Il est donc envisageable que l'Union Européenne prenne des décisions quant à la restriction à moyen terme (et possiblement l'interdiction) de l'utilisation des traitements hormonaux à usage vétérinaire.

Dans ce contexte ma thèse avait deux objectifs :

- d'une part l'identification de nouvelles mutations à effet majeur sur la prolificité dans les populations ovines allaitantes françaises pour lesquelles une hypothèse de ségrégation avait été avancée ;

- et d'autre part, dans le cas bien précis de la mutation *FecL<sup>L</sup>* gérée dans la population Lacaune, établir un éventuel effet pléiotrope sur d'autres caractères zootechniques comme, la croissance, la mise en place de la puberté, ou encore la sensibilité aux hormones de synchronisation des cycles œstriens.

*Les deux objectifs de cette thèse sont articulés en deux parties dans la présentation des résultats et avaient fait l'objet de deux dépôts de projet préalables qui ont financés ce travail. Le premier objectif correspond au projet PROLIGEN « Mise en évidence et analyse fonctionnelle des mutations affectant la prolificité des ovins allaitants » financé par APIS-GENE (<http://www.apis-gene.com>) qui regroupe les professionnels des filières ruminants et qui oriente et définit des programmes de recherche en génomique. Le second objectif est réalisé dans le cadre du projet franco-espagnol PIRINNOVI (EFA103/15) « Innovation technique et efficacité productive des élevages des races ovines locales des territoires pyrénéens pour améliorer leur durabilité » financé par le fonds européen de développement régional FEDER dans le cadre du programme Interreg POCTEFA 2014-2020 (<https://www.poctefa.eu/fr/>). J'ai également pu participer au parcours doctoral de l'Ecole internationale de recherche Agreenium (EIR-A). Cette école donne l'opportunité de suivre deux séminaires de formations ouvertes sur les grands enjeux actuels, de créer un partenariat scientifique et de découvrir le fonctionnement d'un laboratoire à l'étranger, de se créer un réseau de jeunes chercheurs sur des thématiques variées, et de valoriser ce parcours par l'obtention du label EIR-A.*



# Résultats

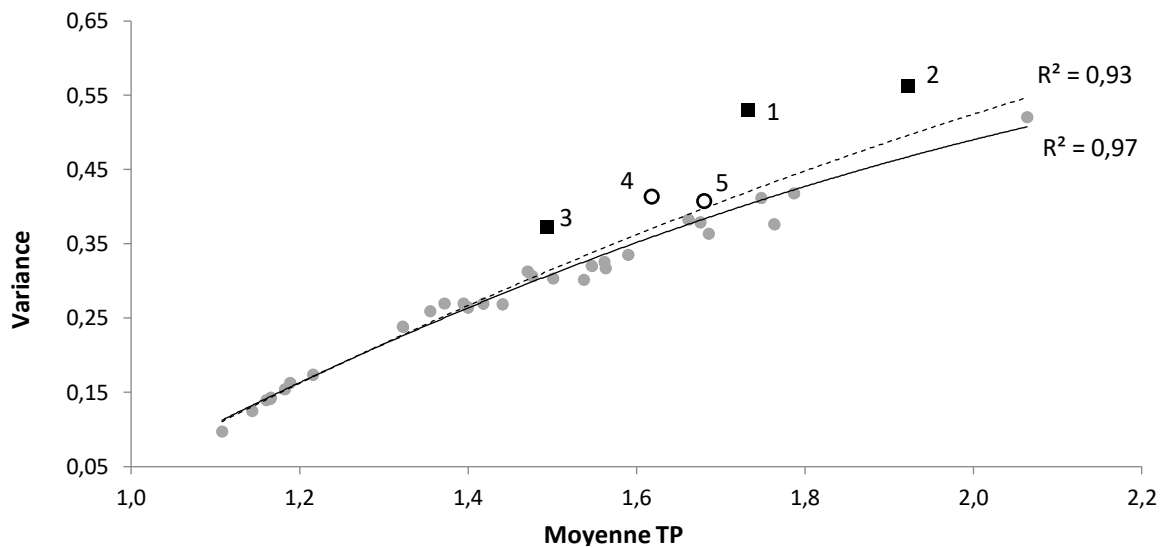


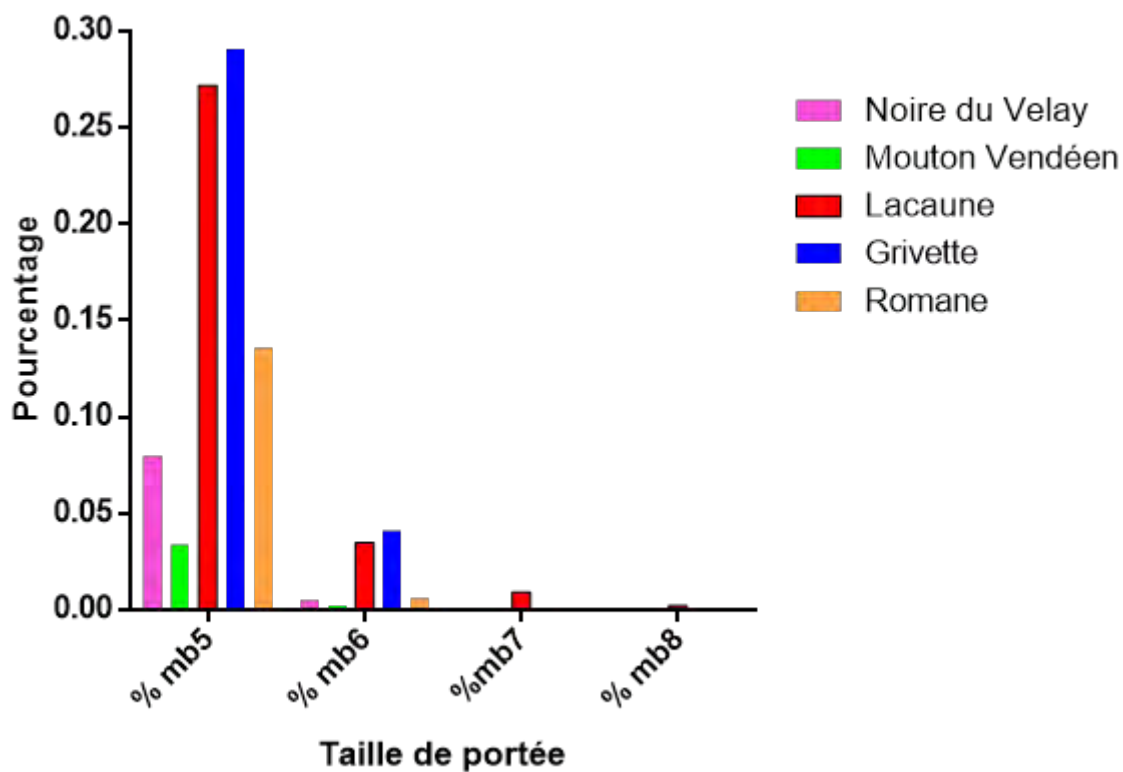
Figure 40: Représentation graphique de la relation entre la moyenne et de la variance de la taille de la portée pour 35 races ovines.

Les données de taille de portée (TP) sont issues de la base de données nationale française OVAL et de la base de données pour l'évaluation génétique des Rasa Aragonesa en Espagne. Chaque point ou carré correspond à une des 35 populations analysées. Les carrés noirs indiquent les races pour lesquels une mutation à effet majeur sur la prolificité a été identifiée (1=Grivette,  $FecX^{Gr}$  ; 2=Lacaune,  $FecX^L$  et  $FecL^L$  ; 3=Rasa Aragonesa,  $FecX^R$ ). La ligne en pointillés est la courbe de régression polynomiale d'ordre 2 modélisant la relation moyenne/variance de l'ensemble des races ( $r^2=0,93$ ). La ligne continue est la courbe de régression polynomiales d'ordre 2 sans les carrés noirs ( $r^2=0,97$ ). Les cercles blancs sont des races soupçonnées d'être porteuses d'une mutation à effet majeur sur la prolificité (4=Noire du Velay ; 5=Mouton Vendéen).

# Partie 1 – Mise en évidence de mutations à effet majeur sur la prolificité

Mon premier objectif de thèse était de découvrir des mutations de prolificité en explorant de façon exhaustive les populations ovines allaitantes françaises, mais aussi quelques populations étrangères, pour lesquelles une hypothèse, plus ou moins forte, de ségrégation d'un gène majeur était proposée. Pour chaque race dans laquelle j'ai découvert de telles mutations, j'apporterai quelques éléments supplémentaires à ceux décrits dans la situation du sujet, en particulier les choix faits pour la sélection des animaux afin de répondre de façon moléculaire à cette hypothèse de ségrégation de mutation. Comme indiqué précédemment, 16 mutations sont actuellement connues, 4 d'entre-elles ségrégent de façon naturelle (*FecL<sup>L</sup>*, *FecB<sup>B</sup>*, *FecX<sup>L</sup>* et *FecX<sup>Gr</sup>*), ou après introgression (*FecB<sup>B</sup>*) dans les populations françaises. Forte de ces informations, j'ai tout d'abord développé une approche mutations et gènes candidats, puis en absence de résultat par cette approche, j'ai développé une approche globale d'analyse d'association (GWAS).

Chacune de ces approches ont fait l'objet d'un article scientifique en anglais inséré dans chaque partie et précédé d'un résumé complet en français. Ces résultats, qui ont concerné les populations Noire du Velay et Mouton Vendéen sont également complétés par les analyses faites pour d'autres populations. Afin de faciliter la compréhension et d'alléger ce chapitre, les matériels et méthodes non décrits ou décrits succinctement dans les articles sont regroupés dans des fiches de procédures expérimentales (PE) placées en annexe.



mb=mise bas

Figure 41: Pourcentage de portées extrêmes dans différentes races françaises.

Tableau 7: Répartition des tailles de portée en 2018 en race Noire du Velay et Mouton Vendéen.

#### Noire du Velay

##### ALLAITEMENT ET MORTALITE

âge mère		mode de naissance agneaux	agneaux nés vivants	agneaux morts après naissance
< 19 mois	simple		456	59
	double		685	112
	triple et plus		127	25
≥ 19 mois	simple		2 280	168
	double		5 783	618
	triple et plus		2 038	388
total			11 369	1 370

agneaux déclarés mort-nés : 1 034 ( 8,3 %)

#### Mouton Vendéen

##### ALLAITEMENT ET MORTALITE

âge mère		mode de naissance agneaux	agneaux nés vivants	agneaux morts après naissance
< 19 mois	simple		616	69
	double		1 059	134
	triple et plus		147	20
≥ 19 mois	simple		2 002	119
	double		5 447	491
	triple et plus		1 699	182
total			10 970	1 015

agneaux déclarés mort-nés : 1 187 ( 9,8 %)

Source : Contrôle de performance 2018 ; IDELE

# I. Approche mutations et gènes candidats

## A. Populations Noire du Velay et Mouton Vendéen

### 1) Principaux résultats

La distribution des tailles de portée (TP) suit approximativement une distribution binomiale pour laquelle la variance est directement liée à la moyenne (Bodin et al., 1989). En règle générale, le pourcentage de naissance triple est relativement bas, moins de 1% des mises bas. Sur la base des données du contrôle de performance enregistrées dans la base de données OVAL, en collaboration avec Loys Bodin (INRA GenPhySE), nous avons extrait la carrière d'agnelage des femelles issues de 34 races pures françaises depuis 2005. À cela nous avons ajouté les carrières de la base de données pour l'évaluation génétique (UPRA-Grupo Pastores) de la race Rasa Aragonesa en Espagne. Ces données représentent 2 353 324 mises bas naturelles sans traitement de synchronisation hormonale de l'œstrus. Nous avons pu représenter la moyenne de prolificité de ces 35 races allaitantes en fonction de la variance associée à la taille de portée (Figure 40).

La variance augmente avec la moyenne de la taille de portée suivant une relation quasiment linéaire (ligne pointillée :  $r^2=0,93$ ). L'augmentation de cette variance dans les races les plus prolifiques est due à l'apparition de portée de taille extrême allant jusqu'à 8 agneaux en Lacaune par exemple (Figure 41). Malgré la relation forte entre variance et taille de portée, plusieurs races semblent échapper à cette relation présentant une variance observée bien plus élevée que celle attendue étant donné leur niveau de prolificité. Il s'agit des races Grivette, Lacaune, Rasa Aragonesa et Noire du Velay (notées respectivement de 1 à 4 sur la Figure 40). De façon intéressante, trois de ces races, Grivette, Lacaune, Rasa Aragonesa sont respectivement porteuses des mutations à effet majeur sur la prolificité :  $FecX^{Gr}$ ,  $FecL^L/FecX^L$  et  $FecX^R$ .

Dans un second temps, nous avons exclu ces trois races de l'analyse, ce qui a permis d'améliorer la relation entre variance et moyenne de la taille de portée (ligne continue :  $r^2=0,97$ , Figure 40). Ainsi, cela confirme l'écart observé pour la race Noire du Velay et fait plus clairement apparaître une race supplémentaire, le Mouton Vendéen (notée 5 sur la Figure 40). De plus, en regardant plus finement les données sur la distribution des tailles de portée, on s'aperçoit que la proportion de naissances triple et plus, représente environ 20% des portées dans ces deux races (Tableau 7). Enfin, pour ces deux races, il existe des enregistrements de naissance sur des portées supérieures ou égales à 5 agneaux comme observé pour les deux autres races françaises porteuses d'une mutation à effet majeur sur la prolificité, Lacaune et Grivette (Figure 41).

Tableau 8 : Nombre d'animaux (Noire du Velay et Mouton Vendéen) et moyenne de prolificité utilisé pour l'approche mutation candidate.

	Peu prolifique	Très prolifique
<i>Noire du Velay</i>	21	35
<i>moyenne TP</i>	≤1,6	≥2,0
<i>Mouton Vendéen</i>	27	87
<i>moyenne TP</i>	≤1,20	≥2,20

Tableau 9: Résultats de génotypage des mutations *FecL*<sup>L</sup>, *FecX*<sup>L</sup> et *FecX*<sup>Gr</sup> pour les brebis Noire du Velay et Mouton Vendéen de prolificité extrêmes.

Breed	Prolific group	Locus/ Genotype								
		<i>FecL</i>			<i>FecX</i>			<i>FecX</i>		
		+/+	+/L	L/L	+/+	+/L	L/L	+/+	+/Gr	Gr/Gr
Noire du Velay	Low (n = 21)	21	0	0	21	0	0	21	0	0
	High (n = 35)	10	23	2	35	0	0	35	0	0
Mouton Vendéen	Low (n = 27)	27	0	0	27	0	0	27	0	0
	High (n = 87)	87	0	0	87	0	0	56	29	2

Table 2 Article 1 ; Chantepie et al. 2018



L'ensemble de ces éléments m'a permis de suspecter la ségrégation d'un gène majeur de prolificité dans ces deux populations, Noire du Velay et Mouton Vendéen, et j'ai décidé dans un premier temps de suivre une approche de mutation candidate sur la base des trois mutations qui ségrégent naturellement dans les races ovines françaises, *FecL<sup>L</sup>*, *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecX<sup>L</sup>*. Pour cela, j'ai effectué une sélection, dans chaque population, de brebis basée sur leur moyenne de prolificité obtenue sur un minimum de 3 mises bas sur œstrus naturel avec un dernier enregistrement de mise bas compatible avec la possibilité d'un prélèvement sanguin. En coopération avec les organismes de gestion des deux races (ROM sélection, section Noire du Velay ; et OES Mouton Vendéen), j'ai pu avoir accès à des échantillons de sang de 122 brebis hautement prolifiques (moyenne TP  $\geq 2$ ) et 48 brebis peu prolifiques (moyenne TP  $\leq 1,6$ ). Les effectifs par race et par groupe de prolificité sont présentés dans le Tableau 8.

Par la technique d'amplification spécifique d'allèle fluorescent KASP (PE 1) déjà disponible au laboratoire, j'ai pu génotyper les 3 mutations en ségrégation dans les races françaises, *FecL<sup>L</sup>*, *FecX<sup>L</sup>* et *FecX<sup>Gr</sup>*. J'ai découvert la ségrégation de la mutation *FecL<sup>L</sup>* du gène *B4GALNT2* et la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* du gène *BMP15* respectivement en Noire du Velay et Mouton Vendéen. De façon remarquable, ces deux mutations ne ségrégent que dans les groupes de brebis hautement prolifiques dans les deux races (Tableau 9). Mais, afin d'éviter tout biais dû au choix d'animaux extrêmes pour l'estimation de la fréquence et de l'effet des mutations, un échantillonnage important d'animaux non choisis sur la taille de portée a été réalisé dans les deux races. En race Noire du Velay, 2728 brebis d'âges différents ont été collectées dans 22 élevages, alors qu'en Mouton Vendéen c'est une cohorte de renouvellement d'agnelles qui a été échantillonnée pour un total 1200 prélèvements. Suite au génotypage de ces échantillons, j'ai pu estimer la fréquence de l'allèle *FecL<sup>L</sup>* à 11% dans la population Noire du Velay avec 20% de brebis hétérozygotes et 1% de brebis porteuses homozygotes. La fréquence de l'allèle *FecX<sup>Gr</sup>* est deux fois plus faible en Mouton Vendéen avec 5% et la présence de 10% de brebis hétérozygotes et quelques brebis homozygotes fertiles (0,3%). L'effet des mutations sur la prolificité a été estimé par un modèle linéaire mixte sur l'ensemble des données de mise base sur œstrus naturel de toutes les brebis nées après l'an 2000 et de leur pédigrée. Les génotypes étaient soit inconnus ou bien déterminés par les génotypages que j'ai réalisés. Le modèle prend en compte divers effets fixes comme le troupeau, l'année de naissance, l'âge à l'agnelage, la saison d'agnelage et le génotype ; et des effets aléatoires comme l'environnement permanent et un effet génétique additif animal. Ainsi l'effet estimé de *FecL<sup>L</sup>* est de +0,4 agneau par mise bas en race Noire du Velay (+0.45 par comparaison des moyennes brutes non

Tableau 10: Fréquence des génotypes aux loci *FecL* et *FecX* et prolificité associée en Noire du Velay et Mouton Vendéen.

Genotype	Breed / Locus					
	Noire du Velay / <i>FecL</i> (n = 2728)			Mouton Vendéen / <i>FecX</i> (n = 1200)		
	+/+	+/L	L/L	+/+	+/Gr	Gr/Gr
Number	2151	548	29	1076	121	3
Frequency (%)	78.8	20.1	1.1	89.7		10.3
SE <sup>1</sup> of frequency (%)	0.8	0.8	0.2	0.9		0.9
Raw mean LS <sup>2</sup>	1.58	2.03	2.18	1.55		2.01

Table 4 Article I; Chantepie et al. 2018

<sup>1</sup> SE=Standard error

<sup>2</sup> LS=Litter size

corrigées par le modèle mixte, Tableau 10). En mouton Vendéen, l'effet de  $FecX^{Gr}$  est estimé à +0,3 agneau par mise bas (+0,46 non corrigé, Tableau 10).

Par cette approche de mutations candidates, j'ai pu identifier deux mutations à effet majeur sur la prolificité déjà connues dans les populations Lacaune et Grivette, mais qui expliquent également la forte variance de prolificité dans les populations Noire du Velay et Mouton Vendéen. Ces résultats confirment également la possibilité de la ségrégation d'une même mutation de prolificité dans des populations différentes et qui conserve son action majeure sur ce caractère dans des fonds génétiques différents.

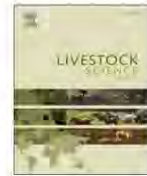
L'ensemble de ces résultats ont été publiés dans l'article 1 « Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du Velay and Mouton Vendéen sheep breeds » et présenté ci-après.

2) [Article 1 - Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du Velay and Mouton Vendéen sheep breeds, Livestock Science](#)



Contents lists available at ScienceDirect

Livestock Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/livsci](http://www.elsevier.com/locate/livsci)

## Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du Velay and Mouton Vendéen sheep breeds



L. Chantepie, L. Bodin, J. Sarry, F. Woloszyn, J. Ruesche, L. Drouilhet, S. Fabre\*

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

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Ovine  
Major gene  
Prolificacy  
BMP15  
B4GALNT2

## ABSTRACT

For many decades, prolificacy has been selected in meat sheep breeds as a polygenic trait but with limited genetic gain. However, the discovery of major genes affecting prolificacy has changed the way of selection for some ovine breeds implementing gene-assisted selection as in the French Lacaune and Grivette meat breeds, or in the Spanish Rasa Aragonesa breed. Based on statistical analysis of litter size parameters from 34 French meat sheep populations, we suspected the segregation of a mutation in a major gene affecting prolificacy in the Noire du Velay and in the Mouton Vendéen breeds exhibiting a very high variability of the litter size. After the genotyping of mutations known to be present in French sheep breeds, we discovered the segregation of the *FecL<sup>L</sup>* mutation at the *B4GALNT2* locus and the *FecX<sup>Gr</sup>* mutation at the *BMP15* locus in Noire du Velay and Mouton Vendéen, respectively. The frequency of ewes carrying *FecL<sup>L</sup>* in the Noire du Velay population was estimated at 21.2% and the Mouton Vendéen ewes carrying *FecX<sup>Gr</sup>* at 10.3%. The estimated mutated allele effect of *FecL<sup>L</sup>* and *FecX<sup>Gr</sup>* on litter size at +0.4 and +0.3 lamb per lambing in Noire du Velay and Mouton Vendéen, respectively. Due to the fairly high frequency and the rather strong effect of the *FecL<sup>L</sup>* and *FecX<sup>Gr</sup>* prolific alleles, specific management programmes including genotyping should be implemented for a breeding objective of prolificacy adapted to each of these breeds.

In ovine breeds raised for meat purposes, numerical productivity represents an important technical and economic lever. The objective is to reach an optimum for the economic profitability of breeding. Improvement of this numerical productivity is achieved by increasing the number of lambs born per ewe at each lambing, i.e. the prolificacy, associated with the improvement of lamb viability as well as the maternal quality. This leads to increased post-natal survival and growth rate of the lambs. For decades, genetic selection efforts have been made particularly on improving prolificacy of sheep breeds. However, prolificacy is a weakly heritable polygenic trait ( $h^2 = 0.05 - 0.2$ ) (see the review by Bradford (Bradford, 1985)), allowing limited genetic gain. Nevertheless in some breeds, a very large effect on ovulation rate (OR) and litter size (LS) due to single mutation in fecundity major genes (called *Fec* genes, reviewed in Fabre et al. (2006)) has been demonstrated. The first evidence of the segregation of a prolificacy major gene was established in the early 1980's in Australian Booroola Merino. This was implicated by the observation of a large variability of LS and OR in this population and the presence of extremely prolific ewes in this low prolific breed (Piper and Bindon, 1982; Davis et al., 1982). The causal mutation named *FecB<sup>B</sup>* was discovered 20 years later in the *BMP1B* gene (Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B) on the ovine

chromosome 6 by several independent research groups (Wilson et al., 2001; Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001). This mutation was thereafter introgressed in several ovine breeds around the world for research purposes or to improve their prolificacy although these latter programmes resulted in mixed outcomes (Walkden-Brown et al., 2009).

Up to now, many mutations were discovered worldwide in three other major genes namely *BMP15* (known as *FecX* (Galloway et al., 2000)), *GDF9* (known as *FecG* (Hanrahan et al., 2004)) and *B4GALNT2* (known as *FecL* (Drouilhet et al., 2013)). In France particularly, two genetic programmes were implemented to discover and to manage mutations with major effect in order to improve the prolificacy of commercial sheep populations (Mulsant et al., 2003; Bodin et al., 2011; Martin et al., 2014). The introgression of the Booroola *FecB<sup>B</sup>* mutation was started in Mérinos d'Arles in the 1980's. Experimental testing by the French agricultural institute INRA has estimated the effect of the mutated allele on prolificacy at one extra lamb per lambing (Teyssier et al., 1997). A controlled diffusion of genotyped animals in commercial flocks is now implemented in the Mérinos d'Arles population (Teyssier et al., 2009). In the Lacaune breed, two different mutations affecting prolificacy were discovered in the selection nucleus of the OVI-TEST cooperative, *FecX<sup>L</sup>* in the *BMP15* gene on the

\* Corresponding author.

E-mail address: [stephane.fabre@inra.fr](mailto:stephane.fabre@inra.fr) (S. Fabre).<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.07.007>

Received 16 March 2018; Received in revised form 6 July 2018; Accepted 9 July 2018

1871-1413/© 2018 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

chromosome X (Bodin et al., 2007), and *FecL*<sup>L</sup> at the *B4GALNT2* locus on the chromosome 11 (Drouilhet et al., 2009, 2013). As soon as 2005, it was decided to eradicate the *FecX*<sup>L</sup> mutation inducing sterility at the homozygous state and to manage the *FecL*<sup>L</sup> mutation which increases LS by +0.5 lamb per lambing. The selection objective is to achieve 50% of heterozygous *FecL*<sup>L</sup> carrier ewes in the Lacaune OVI-TEST selection nucleus flocks (Martin et al., 2014; Raoul et al., 2017).

Beyond these genetic programmes, research of putative mutations affecting LS was undertaken in several French and foreign sheep populations, leading to the discovery of three original causal mutations affecting the *BMP15* gene in the French Grivette, the Polish Olkuszka and the Tunisian Barbarine breeds (Demars et al., 2013; Lassoued et al., 2017). In contrast with the seven other known mutations in the *BMP15* gene affecting prolificacy, the homozygous Grivette and Olkuszka carrier ewes are not sterile but hyper-prolific (Demars et al., 2013).

In the present paper, we present an analysis of LS data from 34 French and one Spanish meat sheep breeds highlighting the suspicion of a mutation in a major gene in two of them, the Noire du Velay and the Mouton Vendéen breeds. Through molecular genotyping we evidenced the segregation of mutations already known to control OR and LS in ovine breeds. Moreover, we give an early analysis of frequency and effects of these two mutations in commercial populations.

## 1. Material and methods

### 1.1. Data and statistical analysis

**Relationship between mean and variance of LS.** Data come from the OVALL French national database for meat sheep genetic evaluation and research managed by the Institut de l'Élevage (French Livestock Institute) and the Centre de Traitement de l'Information Génétique (Genetic Information Processing Center, Jouy-en-Josas, France) gathering about 12 million lambings from 1986 to 2016. We have extracted the lambing career of purebred females alive in 2005 from 34 different breeds (supplementary Table S1), representing 2,353,324 natural LS obtained without hormonal synchronisation treatment of oestrus. Moreover, we have added LS data from the Spanish database for genetic evaluation of Rasa Aragonesa – UPRA-Grupo Pastores, a breed where the prolific *FecX*<sup>R</sup> mutation is segregating (Martinez-Royo et al., 2008; Fathallah et al., 2016). Basic statistical analysis (mean and variance of the observed LS) were used to characterize each breed as well as to select the animals entering in the genotyping programme.

**Expected frequencies of LS and variance - expected career.** A subsample of the 25 most numerically important French breeds gathering 88,428 ewes with at least 5 LS records each was considered to estimate the parameters of the LS distribution (supplementary Table S1). As in Bodin and Elsen (Bodin et al., 1989), the second order regression coefficients of each LS frequency on the mean prolificacy of the breed were estimated on the subsample of all ewes with 5 records each, excluding the Noire du Velay and Mouton Vendéen breeds as well as those known to carry a major gene for OR. These coefficients ( $\alpha_i$ ,  $\beta_{1i}$ ,  $\beta_{2i}$ ) permitted estimation of the expected frequencies of each LS<sub>i</sub> for a population of a given prolificacy (prol):  $LS_i = \alpha_i + \beta_{1i} \text{ prol} + \beta_{2i} \text{ prol}^2$  and consequently the expected variance which could be compared to the observed frequencies and variance. They were applied to a sample including 3 breeds without obvious major genes (Rava, Rouge de l'Ouest, Charollais), 2 breeds known to carry major genes (Lacaune and Grivette) and the two "suspected breeds" of the present study (Noire du Velay and Mouton Vendéen). According to the threshold model of LS (Gianola, 1982), and using the expected frequencies of these 7 populations, it was also possible to simulate lifetime LS data of females with 5 records each. Thus, 200,000 careers were simulated with a repeatability on the underlying variate equal to 0.20 (i.e. ~0.15 on the observed scale). These simulations provided the expected percentage of animals with 5 lambings which exceed a given mean prolificacy (i.e. 3.0). As before, this gives the expected value in the absence of a major

gene in the population was compared to the observed value.

**Genetic parameter analyses.** The test of deviation from the Hardy Weinberg equilibrium was performed using a Pearson chi square test, while the association between genotypes and prolificacy groups (defined bellow) was analysed using an exact Fisher test which can take into account the very small sample size in some categories of the contingency tables. Both tests were performed using specific functions of the R package (R Development Core Team, 2008).

The heritability [ $h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_p^2 + \sigma_e^2)$ ] and the repeatability [ $r = (\sigma_g^2 + \sigma_p^2) / (\sigma_g^2 + \sigma_p^2 + \sigma_e^2)$ ] were calculated through the estimation of the additive genetic variance  $\sigma_g^2$ , the permanent environmental variance  $\sigma_p^2$  and the residual variance  $\sigma_e^2$ . These variances were estimated by a linear mixed model run with the ASReml software (Gilmour et al., 2014). This model included the flock, the year, the season of lambing, the age and the genotype as fixed effects as well as random effects which were a permanent environmental effect, an animal effect whose terms were linked by a pedigree, and a residual effect. The estimation of the genotype effects were obtained from the same model by the predicted values of the genotype fixed effect.

### 1.2. Animals

**Initial sampling of Noire du Velay and Mouton Vendéen ewes based on extreme LS.** The first suspicions led to selecting very small samples of relevant animals which were genotyped for the 3 known mutations naturally segregating in the French populations (*FecL*<sup>L</sup>, *FecX*<sup>L</sup> in Lacaune and *FecX*<sup>GR</sup> in Grivette). The lists of extreme highly and lowly prolific animals regarding their natural mean LS (without hormonal treatments) over at least 3 lambings were first extracted from the OVALL national database to establish the prolificacy groups. Flocks with at least 5 extreme ewes still alive at that time were selected and blood samples were collected. For the Noire du Velay breed, the final list gathered 56 females in 8 different flocks, 35 high-prolific ewes (LS mean  $\geq 2.0$ ) and 21 low-prolific ewes used as control (LS mean  $\leq 1.6$ ). In the Mouton Vendéen breed, there were 114 samples from adult ewes with 87 high-prolific (LS mean  $\geq 2.20$ ) and 27 low-prolific (LS mean  $\leq 1.20$ ).

**Samples for studies of the frequency and the effects of the encountered mutations.** In order to avoid any bias due to selection, large cohorts of unselected animals were collected in both breeds. For the Noire du Velay breed, the estimation of allele frequencies was made on unselected adult ewes ( $n = 2728$ ) collected in 22 different flock. After genotyping, the allele frequencies were calculated on this sample. The gene effect was estimated by a linear mixed model on the whole natural LS dataset of all ewes born after year 2000. These data (111,654 records from 26,398 females) as well as the pedigree of the animals were extracted from the OVALL national database. Genotypes were either unknown or determined by genotyping. The model included the flock (67 levels), the year of birth (17 levels), the age at lambing (10 levels), the season of lambing (3 levels) and the genotype (4 levels: ++, L+, LL or unknown) as fixed effects, and two random effects: a permanent environmental effect and the animal additive genetic effect.

In the Mouton Vendéen breed, blood sampling of the whole cohort of replacement ewe lambs ( $n = 1200$ ) belonging to 19 flocks of the selection nucleus was undertaken in 2016. A few months after sampling, these ewe lambs had their first lambing allowing estimation of the gene effect at this young age. A few adult sires were also genotyped ( $n = 6$ ) and the production of their daughters extracted from the national database. As for the Noire du Velay breed, the gene effect was estimated by a linear mixed model on the whole natural LS dataset of all ewes born after year 2000. These data (41,269 records from 14,550 females) as well as the pedigree of the animals were also extracted from the OVALL national database and the same model was applied. Levels for the fixed effects were 87 for the flock and 18 for the year of birth.

**Blood sampling and KAPA-KASP genotyping.** Blood samples (5 ml per

**Table 1**  
List of PCR primers used in the study.

Locus/Chromosome	Primer sequence (variant allele underlined)	Position <sup>1</sup> (start, bp)	Application
BMP15 OARX	GGCACTTCATCATTTGGACACT	50,971,433	KAPA PCR <i>FecX<sup>Gr</sup>/FecX<sup>L</sup></i>
	GGCAATCATACCCCTCATACTCC	50,970,959	
	TGTGATGCCACGACTCACTG	50,971,066	KASP PCR <i>FecX<sup>Gr</sup></i>
	CATTGCTCCGCATCTCTATAC	50,971,170	
	CATTGCTCCGCATCTCTATAT	50,971,170	
	GATGGGCTGAAAGTAACCA	50971248	KASP PCR <i>FecX<sup>L</sup></i>
	ACCCGAGGACATACTCCCTTAC	50971137	
	ACCCGAGGACATACTCCCTTAT	50971137	
B4GALNT2/ OAR11	TGGTTCAAACCTCTACATGCAAGA	36938189	KAPA PCR <i>FecL<sup>L</sup></i>
	TATGCATGGCATGTGATAGG	36938314	
	TATGCATGGCATGTGATAGG	36938314	KASP PCR <i>FecL<sup>L</sup></i>
	GCAAGAAGCTGCGTGTGT	36938207	
	GCAAGAAGCTGCGTGTGA	36938207	

<sup>1</sup> Start positions of primers (in base pair) are based on the OARv3.1 ovine genome assembly

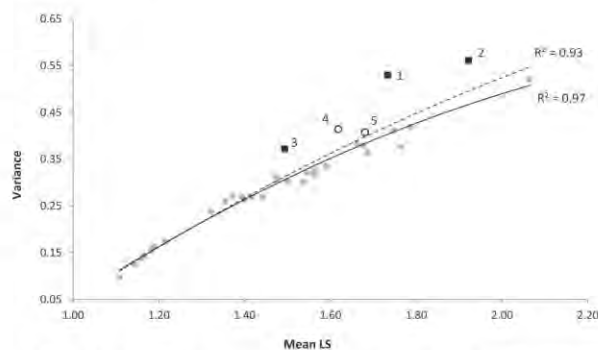
animal) were collected from jugular vein by Venoject system containing EDTA in commercial flocks and directly stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further use. Genotyping was obtained by a first step of KAPA Blood PCR amplification of a specific fragment encompassing the mutation position (KAPA Biosystems). Primers used for PCR amplification were designed using Primer 3 software (Table 1). A one  $\mu\text{l}$  sample of total blood was run for PCR with a mixture containing 5  $\mu\text{l}$  of KAPA Blood kit solution and 0.25  $\mu\text{l}$  of each specific primer at 10 nM in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ . PCR amplifications were conducted independently for each locus on an ABI 2400 thermocycler (Applied Biosystems) with the following conditions: 5 min initial denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$ , 32 cycles of 30 s at the melting temperature, 30 s extension at  $72^{\circ}\text{C}$  and 30 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , followed by 5 min final extension at  $72^{\circ}\text{C}$ .

In the second step, the specific resulting KAPA Blood PCR fragments were used as template for the genotyping of *FecL<sup>L</sup>* (B4GALNT2 intron 7, OAR11:36938224T>A, NC\_019468, (Drouilhet et al., 2013)), *FecX<sup>L</sup>* (BMP15 exon 2, OARX: 50980449G>A, NC\_019484, (Bodin et al., 2007)) or *FecX<sup>Gr</sup>* (BMP15 exon 2, OARX: 50980461C>T, NC\_019484, (Demars et al., 2013)). The genotyping was done by fluorescent Competitive Allele Specific PCR via the KASP V4.0 2x Master mix (LGC genomics) as follow: reaction of 1.2  $\mu\text{l}$  of the KAPA Blood PCR product, 0.07  $\mu\text{l}$  primers premix and 2.5  $\mu\text{l}$  of the 2x KASP Master mix. The primers premix is prepared as follow: 1.2  $\mu\text{l}$  of each forward fluorescent allele specific primers at 100  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{l}$  of the common reverse primer at 100  $\mu\text{M}$  in a final volume of 10  $\mu\text{l}$ . Primers used for KASP PCR amplification are indicated in the Table 1. The PCR amplification condition was 15 min at  $94^{\circ}\text{C}$  for the hot-start activation, 10 cycles of 20 s at  $94^{\circ}\text{C}$ , 61–55  $^{\circ}\text{C}$  for 60 s (dropping  $0.6^{\circ}\text{C}$  per cycle), then 26 cycles of 20 s at  $94^{\circ}\text{C}$  and 60 s at  $55^{\circ}\text{C}$ . KASP genotyping was analysed by a final point read of the fluorescence on an ABI 7900HT Real-Time PCR System and using the SDS Software 2.4 (Applied Biosystems).

## 2. Results

### 2.1. Suspicion of mutation in major genes affecting prolificacy

As previously described, as long as there are less than 1% triplets in a sheep population, the distribution of LS approximately follows a binomial distribution for which the variance is directly linked to the mean (Bodin et al., 1989). For the breeds with a higher percent of triplets, the mean-variance relationship remains very strong. A plot of the relationship between mean and variance of LS following natural oestrus in 34 different French breeds and one Spanish breed is shown in Fig. 1



**Fig. 1.** Plot of mean and variance of litter size for 35 sheep breeds. Data are from the French national OVALL database for genetic evaluation and research – Institut de l'Élevage, France and the database for genetic evaluation of Rasa Aragonesa – UPRA-Grupo Pastores, Spain (2,353,324 natural LS of purebred ewes alive in 2005). Each spot corresponds to a given population (see supplementary Table S1). The black squares correspond to breeds with an identified mutation in a major gene affecting prolificacy (1 = Grivette, *FecX<sup>Gr</sup>*; 2 = Lacaune, *FecX<sup>L</sup>* and *FecL<sup>L</sup>*; 3 = Rasa Aragonesa, *FecX<sup>L</sup>*). The dashed line is the quadratic regression curve modelling all points ( $R^2 = 0.93$ ). The plain line is the quadratic regression modelling points without black squares ( $R^2 = 0.97$ ). The open circles are breeds suspected to carry a mutation in a major gene affecting prolificacy (4 = Noire du Velay; 5 = Mouton Vendéen).

(numerical data in supplementary Table S1). The breeds in which a mutation in a major gene is segregating were distinctly marked (Lacaune, Grivette and Rasa Aragonesa, black squares) and clearly stood out from the quadratic trendline (dashed line) which had a high  $r^2$  (0.93). Excluding the three breeds with known mutations in major genes gave a quadratic trendline (plain line) with a higher  $r^2$  (0.97). Based on this second trendline, the Fig. 1 shows that the Noire du Velay and Mouton Vendéen breeds (circles) also clearly deviated from their expected place, which could suggest the segregation of a mutation in a major gene in these two populations.

Following this first hint, we analysed the evolution of the mean prolificacy of the 34 French breeds between 1986 and 2016. In the Fig. 2, we have plotted the overall annual mean LS weighted by the number of individuals in each population. We observed a regular increase of the mean LS of these breeds during the last three decades corresponding to +0.70 lamb/100 ewes/year. In contrast to the increase observed for the Lacaune, Grivette and Noire du Velay breeds,



**Fig. 2.** Annual evolution of mean prolificacy in French sheep breeds. Litter size (LS) data from 1986 to 2016 are from the French national OVAL database for genetic evaluation and research. The annual mean LS is plotted year by year for each breed (plain lines) and for the whole populations weighted by the number of individuals in each population (dashed line, weighted  $\mu$ ). NdV denotes the Noire du Velay breed.

the Mouton Vendéen breed showed a slight regular decrease of its mean LS. Remarkably, the Noire du Velay breed had a strong increase of the mean LS with +1.40 lambs/100 ewes/year, twice as fast as what was observed for the overall mean and even faster than the Lacaune and Grivette breeds (respectively +0.68 and +0.75 lambs/100 ewes/year), known to carry a mutation in a major gene increasing prolificacy. Even if we could suppose that a strong improvement of the environment had occurred for improving the prolificacy of the Noire du Velay breed during the last decades, we can also speculate on the segregation of mutation in major genes influencing this trait.

The ratio of the observed distribution of each LS class to its expectation (provided by regression coefficients estimated on a large dataset) is given by  $\rho$  in Table 2. Estimations of LS frequencies were very close to the observed values for the Rava, the Rouge de l'Ouest and the Charollais breeds, as  $\rho$  ranged from 0.98 to 1.03. In contrast,  $\rho$  for the Noire du Velay and the Mouton Vendéen breeds ranged further

apart from 1 (0.91 to 1.36). Similar results were obtained for the two breeds carrying a mutation in a major gene, Lacaune and Grivette ( $\rho$  ratio from 0.89 to 1.24). Consequently,  $\rho$  ratios for LS variance were remarkably close to 1 for the non-carrier breeds in contrast to those of the Lacaune and Grivette as well as the Noire du Velay and Mouton Vendéen breeds (ranging from 1.08 to 1.32). Thus, the LS distributions observed in Noire du Velay and Mouton Vendéen breeds break the rules of homogenous populations and suggested for each breed a mixture of females with different prolificacy level.

The final hint was the excess of highly prolific animals in these breeds (Table 2). The observed number of females having a mean prolificacy higher than 3 on five records were generally low for all the main French breeds with mean LS under 2.0. Obviously, this parameter increased regularly when the mean prolificacy of the population increased, however it was higher for the breeds known to carry or suspected to carry a mutation in a major gene reaching 28% in Grivette, for example (Table 2). Furthermore,  $\rho$  was close to 1 for the non-carrier breeds and higher for the other breeds. For the Noire du Velay breed, the number of females with a prolificacy higher than 3 was 16 times higher than expected for a comparable population without mutation in a major gene. Although this parameter was lower for the Mouton Vendéen breed, it was higher than for the non-carrier breeds.

**2.2. Genotyping of known mutations affecting prolificacy in French ovine populations:  $FecL^L$ ,  $FecX^L$  and  $FecX^{Gr}$**

Extremely low and high-prolific ewes from the Noire du Velay ( $n = 56$ ) and Mouton Vendéen ( $n = 114$ ) populations were genotyped for the 3 known mutations naturally segregating in the French populations i.e.  $FecL^L$ ,  $FecX^L$  in Lacaune and  $FecX^{Gr}$  in Grivette (Table 3). The  $FecX^L$  mutation was not found but the  $FecL^L$  allele was found in the Noire du Velay high-prolific group and the  $FecX^{Gr}$  allele was found in the high-prolific group of Mouton Vendéen ewes (Table 3). All the low-prolific ewes from both breeds were wild-type at the genotyped loci. For both breeds, the exact Fisher test was highly significant ( $P < 0.001$ )

**Table 2**  
Distributions of litter size in seven different breeds carrying - or not - mutation in major gene influencing prolificacy.

Breed	Mut	Mean LS	LS variance		%LS =							
			Obs	$\rho$	1		2		3		%♀ with LS $\geq 3.0$ over 5 lambings	
					Obs	$\rho$	Obs	$\rho$	Obs	$\rho$	Obs	$\rho$
Rava	no	1.50	0.31	1.01	52.9	1.00	44.4	1.00	2.6	0.98	0.0	E = 0
Rouge de l'Ouest	no	1.78	0.41	1.00	33.1	1.00	56.2	1.00	10.7	1.02	2.5	0.9
Charollais	no	1.70	0.39	1.01	38.1	1.00	53.9	0.99	8.0	1.03	1.8	1.4
Noire du Velay	?	1.62	0.43	1.23	46.7	1.07	46.1	0.91	7.7	1.36	5.7	16.2
Mouton Vendéen	?	1.72	0.42	1.08	37.8	1.03	52.6	0.96	9.6	1.13	3.6	2.7
Lacaune	yes	1.75	0.53	1.32	39.0	1.11	49.4	0.89	11.6	1.24	18.2	10.5
Grivette	yes	1.92	0.56	1.24	28.7	1.12	54.3	0.92	17.8	1.09	28.3	3.07

Mut = Prolific mutation; LS = Litter size; Obs = observed distribution of the parameters (% or %); E = expected parameters estimated through the second order regression of the LS on the mean prolificacy;  $\rho = \text{Obs} / E$

**Table 3**  
 $FecL^L$ ,  $FecX^L$  and  $FecX^{Gr}$  genotypes of few extreme ewes for each breed and prolificacy group.

Breed	Prolific group	Locus/ Genotype								
		$FecL^L$			$FecX^L$			$FecX^{Gr}$		
		+ / +	+ / L	L / L	+ / +	+ / L	L / L	+ / +	+ / Gr	Gr / Gr
Noire du Velay	Low ( $n = 21$ )	21	0	0	21	0	0	21	0	0
	High ( $n = 35$ )	10	23	2	35	0	0	35	0	0
Mouton Vendéen	Low ( $n = 27$ )	27	0	0	27	0	0	27	0	0
	High ( $n = 87$ )	87	0	0	87	0	0	56	29	2

**Table 4**  
FecL<sup>L</sup> and FecX<sup>Gr</sup> genotyping in the Noire du Velay and Mouton Vendéen populations.

Genotype	Breed / Locus					
	Noire du Velay / FecL (n = 2728)			Mouton Vendéen / FecX (n = 1200)		
	+/+	+/L	L/L	+/+	+/Gr	Gr/Gr
Number	2151	548	29	1076	121	3
Frequency (%)	78.8	20.1	1.1	89.7	10.3	
SE <sup>1</sup> of frequency (%)	0.8	0.8	0.2	0.9	0.9	
Raw mean LS <sup>2</sup>	1.58	2.03	2.18	1.55	2.01	

<sup>1</sup> SE = Standard error

<sup>2</sup> LS = Litter size

showing a clear disequilibrium between prolificacy groups and genotypes of these mutations.

### 2.3. FecL<sup>L</sup> and FecX<sup>Gr</sup> genotype frequency and effect on prolificacy

Large cohorts of unselected animals were genotyped in order to accurately estimate the allele frequencies in the Noire du Velay and the Mouton Vendéen populations (Table 4). In Noire du Velay, the frequency of the L prolific allele at the FecL<sup>L</sup> locus was 0.11 with 20.1% heterozygous and 1.1% homozygous carriers. These frequencies are in Hardy Weinberg equilibrium ( $P = 0.36$ ). Among the Mouton Vendéen replacement ewe lambs, the frequency of the Gr prolific allele at the FecX<sup>Gr</sup> locus was 0.05 and we observed 10.3% carrier ewes (+/Gr and Gr/Gr), only 3 animals being homozygous Gr/Gr. These frequencies were also in Hardy Weinberg equilibrium ( $P = 0.84$ ).

The estimated genetic effects are presented in the Table 5. Genetic parameters were very similar in both breeds. Heritability ( $h^2$ : 0.09) and repeatability ( $r$ : 0.10 to 0.14) were low and in full agreement with the classical values of these parameters for this species (Janssens et al., 2004). A single copy of the FecL<sup>L</sup> in Noire du Velay increased the mean prolificacy by 0.42 lamb per lambing ( $P < 0.001$ ). The additional increase due to a second copy of the mutation in homozygous carriers was lower (0.13;  $P = 0.096$ ). In the Mouton Vendéen breed, the effect of a single copy of the FecX<sup>Gr</sup> allele increased the prolificacy by 0.30 lamb per lambing ( $P < 0.001$ ), while the effect of a second copy leading to a homozygous carrier, does not further increase the prolificacy ( $P = 0.485$ ). In both breeds, as expected, females of the unknown genotype group were slightly, although not significantly, more prolific than the corresponding females known as wild-type.

## 3. Discussion

Simple analyses of livestock industry data suggested the segregation

**Table 5**  
Genetic parameters and allelic estimated values of litter size in Noire du Velay and Mouton Vendéen breeds.

Breed	Genetic parameters							Allelic estimated values			
	n LS	n ♀	$\sigma_g^2$	$\sigma_p^2$	$\sigma_e^2$	$h^2$	$r$	zz	+/+	+/M <sup>a</sup>	M/M
Noire du Velay	111,654	26,398	0.036	0.017	0.334	0.09 (0.005)	0.14 (0.003)	1.60 <sup>a</sup>	1.57 <sup>a</sup>	1.99 <sup>b</sup>	2.12 <sup>c</sup>
Mouton Vendéen	41,269	14,550	0.034	0.005	0.344	0.09 (0.007)	0.10 (0.005)	1.71 <sup>a</sup>	1.68 <sup>a</sup>	1.98 <sup>b</sup>	1.99 <sup>b</sup>

LS = Litter size;  $\sigma_g^2$  = Additive genetic variance;  $\sigma_p^2$  = Permanent environmental variance;  $\sigma_e^2$  = Residual variance;  $h^2$  = Heritability (standard errors are between brackets);  $r$  = Repeatability (standard errors are between brackets); zz = Unknown genotype; ++ = Homozygous wild type, M+ : heterozygous, MM: homozygous mutated type.

<sup>a</sup> M denotes the mutated prolific allele within each breed (FecL<sup>L</sup> or FecX<sup>Gr</sup>)

<sup>b</sup> Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.001$ .

<sup>c</sup> Values within a row with different superscripts differ significantly at  $P < 0.001$ .

of a mutation in a major gene affecting prolificacy of the Noire du Velay and Mouton Vendéen breeds. Small samples of extremely high and low prolific ewes were then genotyped for known mutations and revealed the presence of causal mutations. Among the different strands of evidence, the deviation from the relationship between mean and variance of prolificacy for breeds with a mutation in a major gene comparing to other breeds was quite remarkable. Even if these parameters were calculated without any correction for variation factors, the very high number of observations for each breed, smoothed all the effects and led to a very strong relationship among non-carrying populations. Only LS after natural oestrus were extracted from the national database as using hormonal treatments to induce ovulations modifies the mean-variance relationship (Bodin et al., 1989). Moreover, the within breed variability of LS variance due to polygenic effects is generally very small (Bodin et al., 1989; Amer and Bodin, 2006; Cottle et al., 2016) and could not affect the mean-variance relationship at a broad scale. Finally, the observed deviation was due to the mixture into the populations of two groups of animals widely differing in prolificacy as it had been already viewed in Lacaune (Martin et al., 2014) and in Rasa Aragonesa breed (Fathallah et al., 2016).

The procedure used in the present study is relevant only for genes having large effect (about 0.5 standard deviation of the prolificacy mean). If the presence of known mutations was not found, the process would have been followed by a GWAS to compare allele frequencies between the few selected high (cases) and low (controls) prolific ewes. The selection of two small samples of very extreme animals and their analysis considering they are two states of a qualitative trait has been already successful and allowed the discovery of two new mutations for ovulation rate (Demars et al., 2013). However, as shown in the Table 3, some highly prolific Noire du Velay and Mouton Vendéen ewes were non-carriers of known prolific alleles. Their extreme prolificacy could be either explained by the polygenic determinism of this trait or by the segregation of another major mutation as already described in the Lacaune population carrying both FecX<sup>L</sup> and FecL<sup>L</sup> (Bodin et al., 2007; Drouilhet et al., 2009).

The frequency of carrier ewes is much higher in the Noire du Velay breed (~20%) than in the Mouton Vendéen breed (~10%) which can explain that the deviation from the mean-variance relationship is also higher in this breed. However, the Hardy Weinberg equilibrium is still very well conserved. This means that in both populations prolific allele frequencies are not strongly affected by selection, particularly in the Mouton Vendéen breed as shown by the mean LS evolution during the last three decades. In both breeds it seems that carrier ewes do not produce more replacement ewe lambs in spite of their higher prolificacy and that there is no preferential culling according to the genotype. In Lacaune, Hardy Weinberg equilibrium did not hold for a long time because between 1996 and 2010 the cooperative excluded animals that were too prolific and since 2011 the cooperative's aim has been to achieve 50% of L+ ewes (Martin et al., 2014).



The effects of one copy of the *FecL<sup>L</sup>* mutation on LS is similar in the Noire du Velay (+0.42 lamb per lambing) and in the Lacaune breed (+0.47, (Martin et al., 2014)), and is of the same order of magnitude as the effect of most of other known major genes for prolificacy (Bodin et al., 2011; Jansson, 2014). However, as it has been already noted, the effect of the *FecL<sup>L</sup>* mutation is much higher than the effect of the *FecX<sup>Gr</sup>* mutation observed in the Grivette population (+0.10 lamb per lambing, (Demars et al., 2013)). In Mouton Vendéen, the effect of one copy of the *FecX<sup>Gr</sup>* mutation (+0.30 ± 0.04 lamb per lambing) seems higher than the effect of the same mutation in the Grivette population, although in this latter population, the analysis of the allele effect was not conducted on a large sample. *FecX<sup>Gr</sup>* homozygous carrier ewes in the Grivette or the Mouton Vendéen population are as prolific, if not more, than the heterozygous ones (present work and Demars et al. (2013)), in contrast to most mutations of the *BMP15* gene which induce sterility at the homozygous state (Bodin et al., 2007; Demars et al., 2013).

#### 4. Conclusion

Based on an analysis of a very large LS dataset from 34 French meat sheep breeds and molecular genotyping, we have highlighted and evidenced the segregation of two mutations in the *FecL* and *FecX* major genes in the Noire du Velay and the Mouton Vendéen breeds. We have determined a fairly high frequency (0.05 to 0.11) and a rather strong effect (+0.3 to +0.4 lamb/lambing) of the *FecL<sup>L</sup>* and *FecX<sup>Gr</sup>* prolific alleles. These prolific alleles were already discovered in the Lacaune and Grivette breeds asking the question of the origin of these mutations. From population structure analysis, it has been evidenced that Lacaune and Noire du Velay breeds shared the same origin within the European southern sheep populations that may explain the segregation of the *FecL<sup>L</sup>* mutation in both population (Rochus et al., 2017). In contrast, Mouton Vendéen of northern origin does not seem to be phylogenetically connected with Grivette. However, it seems that terminal crosses for lamb production took place in the Grivette breed using Mouton Vendéen sires, and thus the *FecX<sup>Gr</sup>* allele could have been introgressed from one population to the other by this way. Whatever, this discovery should serve as a basis for implementing specific management programmes, including genotyping of reproducers, in relation with the Noire du Velay and Mouton Vendéen selection organizations in line with their breeding objective of prolificacy.

#### Declaration of interest

The authors declare that they have no competing interests.

#### Ethics statement

The blood sampling procedure was approved (approval number 01171.02) by the French Ministry of Teaching and Scientific Research and local ethical committee C2EA-115 (Science and Animal Health) in accordance with the European Union Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

#### Data repository resources

Raw data from the OVAL database were managed by the Institut de l'Élevage (French Livestock Institute) and the Centre de Traitement de l'Information Génétique (Genetic Information Processing Center, Jouy-en-Josas, France). Derived data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

#### Acknowledgments

We thank Didier Cathalan from ROM Sélection managing the Noire du Velay population and Charline Rousseau from the Mouton Vendéen

selection organization, for their precious help in the planning of blood sampling. We are grateful to the breeders who made their animals available for this study. LC was supported by a PhD grant co-funded by APIS-GENE through the Proligen project and the European Funds for Regional Development (FEDER) through the Interreg POCTEFA programme in the framework of the PIRINNOVI project (EFA103/15). Part of the Noire du Velay sampling was supported by the DEGERAM project co-funded by the FEDER Massif Central, the Régions: Aquitaine, Midi-Pyrénées, Limousin and Auvergne; and the French government.

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.livsci.2018.07.007.

#### References

- Amer, P.R., Bodin, L., 2006. Quantitative genetic selection for twinning rate in ewes. *N.Z. Soc. Anim. Product.*
- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., Mulsant, P., 2007. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology* 148, 393–400.
- Bodin, L., Elsen, J.M., Station d'amélioration génétique des animaux, 1989. Variability of litter size of french sheep breeds following natural or induced ovulation. *Anim. Product.* 535–541.
- Bodin, L., Raoul, J., Demars, J., Drouilhet, L., Mulsant, P., Sarry, J., Tabet, C., Tosser-Klopp, G., Fabre, S., Boscher, M.Y., 2011. Etat des lieux et gestion pratique des gènes d'ovulation détectés dans les races ovines françaises. 18èmes Rencontres Recherches Ruminants. Institut de l'Élevage, Paris, France, pp. 393–400.
- Bradford, G.E., 1985. Selection for litter size. In: Land, R.B., Robinson, D.W. (Eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworths, London, pp. 3–18.
- Cottle, D.J., Gilmour, A.R., Pabiou, T., Amer, P.R., Fahey, A.G., 2016. Genetic selection for increased mean and reduced variance of twinning rate in Belclare ewes. *J. Anim. Breed. Genet.* 133, 126–137.
- Davis, G.H., Montgomery, G.W., Allison, A.J., Kelly, R.W., Bray, A.R., 1982. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *N.Z. J. Agric. Res.* 25, 525–529.
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., Tosser-Klopp, G., Mulsant, P., Nowak, Z., Drobik, W., Martyniuk, E., Bodin, L., 2013. Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genet.* 9, e1003482.
- Drouilhet, L., Lecerf, F., Bodin, L., Fabre, S., Mulsant, P., 2009. Fine mapping of the *FecL* locus influencing prolificacy in Lacaune sheep. *Anim. Genet.* 40, 804–812.
- Drouilhet, L., Mansanet, C., Sarry, J., Tabet, K., Bardou, P., Woloszyn, F., Lluich, J., Harichaux, G., Vigué, C., Monniaux, D., Bodin, L., Mulsant, P., Fabre, S., 2013. The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the *B4GALNT2* gene within the ovary. *PLoS Genet.* 9, e1003809.
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monget, P., Monniaux, D., 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproduct. Biol. Endocrinol.* 4, 20.
- Fathallah, S., Alabart, J.L., Bodin, L., Jimenez-Hernando, M.A., Lahoz, B., Fantova, E., David, I., Jurado, J.J., 2016. Relaciones entre los efectos del gen BMP15 y los efectos poligénicos sobre la prolificidad en la raza ovina Rasa Aragonesa. *Informacion Tecnica Economica Agraria* 112, 45–56.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P.E., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luuro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H., Ritvos, O., 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* 25, 279–283.
- Gianola, D., 1982. Assortative mating and the genetic correlation. *Theor. Appl. Genet.* 62, 225–231.
- Gilmour, A.R., Gogel, B.J., Cullis, B.R., Welham, S.J., Thompson, R., 2014. *ASReml User Guide Release 4.1 Functional Specification*. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, United Kingdom. <http://www.vsnl.co.uk>.
- Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R., Galloway, S.M., 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70, 900–909.
- Janssens, S., Vandepitte, W., Bodin, L., 2004. Genetic parameters for litter size in sheep: natural versus hormone-induced oestrus. *Genet. Select. Evolut.* 36, 543–562.
- Jansson, T., 2014. Genes involved in ovulation rate and litter size in sheep. <http://stud.epsilon.slu.se/6803> Accessed 20 May 2017.
- Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., Rejik, M., Fabre, S., Bedhiaf-Romdhani, S., 2017. *FecXBar* a novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine sheep. *BMC Genet.* 18, 43.
- Martin, P., Raoul, J., Bodin, L., 2014. Effects of the *FecL* major gene in the Lacaune meat sheep population. *Genet. Select. Evolut.* 46, 48.
- Martinez-Royo, A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A., Fantova, E., Bodin, L., Mulsant, P., Serrano, M., Folch, J., Calvo, J.H., 2008. A

- deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genet.* 39, 294–297.
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Bodin, L., Thimonier, J., Monget, P., Lanneluc, I., Monniaux, D., Teyssier, J., Elsen, J.M., 2003. Prolificacy Genes in sheep: the French genetic Programmes 61. *Reproduction*, Cambridge, England, pp. 353–359 Supplement.
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Criblu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognié, Y., Chitour, N., Elsen, J.M., 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 98, pp. 5104–5109.
- Piper, L.R., Bindon, B.M., 1982. Genetic segregation for fecundity in Booroola Merino sheep. In: Barton, R.A., Smith, W.C. (Eds.), *Proceedings of the World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding*. Palmerston North, N.Z, pp. 394–400.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and Environment for Statistical Computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>.
- Raoul, J., Swan, A.A., Elsen, J.-M., 2017. Using a very low-density SNP panel for genomic selection in a breeding program for sheep. *Genet. Select. Evolut.* 49, 76.
- Rochus, C.M., Tortereau, F., Plisson-Petit, F., Restaoux, G., Moreno-Romieux, C., Tosser-Klopp, G., Servin, B., 2017. Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. *BMC Genom.* 19, 71.
- Souza, C.J., MacDougall, C., MacDougall, C., Campbell, B.K., McNeilly, A.S., Baird, D.T., 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRIIB) gene. *J. Endocrinol.* 169, R1–R6.
- Teyssier, J., Bodin, L., Maton, C., Bouquet, P.M., Elsen, J.M., 2009. Biological and economic consequences of introgression of the FecB gene into the French Mérinos d'Arles sheep. In: Walkden-Brown, S.W., van der Werf, J.H.J., Nimbkar, C., Gupta, V.S. (Eds.), *Proceedings of Helen Newton Turner Memorial International Workshop Held Pune Maharashtra India 10-12 Novemb.* 2008. Australian Centre for International Agricultural Research, pp. 128–134.
- Teyssier, J., Elsen, J.M., Bodin, L., Bosc, P., Lefevre, C., Thimonier, J., 1997. Interet zootechnique du gene Booroola en race Mérinos d'Arles. 4èmes Rencontres Recherches Ruminants. Institut de l'Elevage, Paris, France, pp. 223–226.
- Walkden-Brown, S.W., Wolfenden, D.H., Piper, L.R., 2009. Use of the FecB (Booroola) Gene in Sheep-Breeding programs. In *Proceedings of Helen Newton Turner Memorial International Workshop Held Pune Maharashtra India 10-12 Novemb.* 2008. In: Walkden-Brown, S.W., van der Werf, J.H.J., Nimbkar, C., Gupta, V.S. (Eds.), Australian Centre for International Agricultural Research, pp. 100–110.
- Wilson, T., Wu, X.Y., Juengel, J.L., Ross, I.K., Lumsden, J.M., Lord, E.A., Dodds, K.G., Walling, G.A., McEwan, J.C., O'Connell, A.R., McNatty, K.P., Montgomery, G.W., 2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.* 64, 1225–1235.



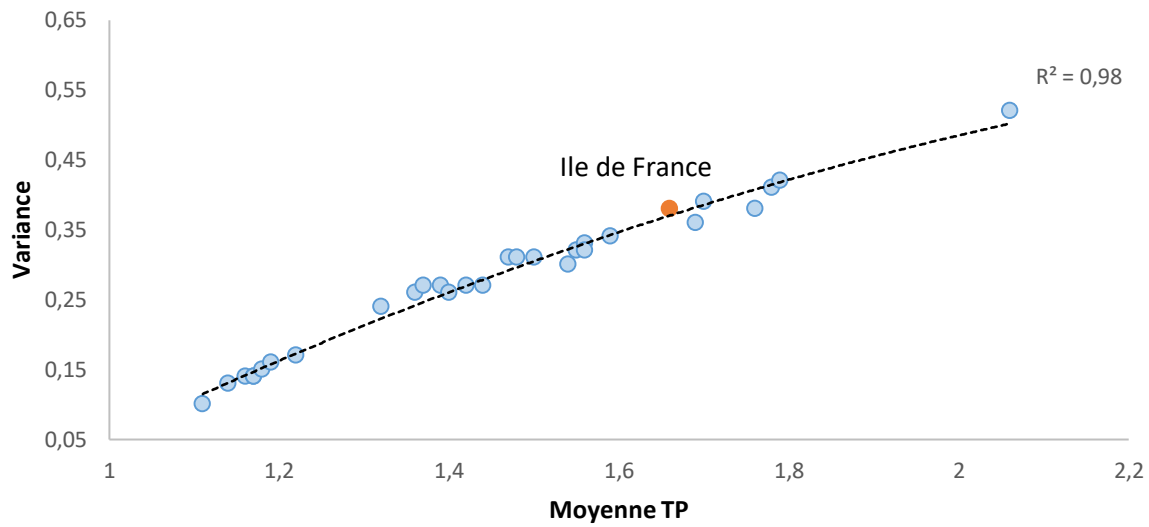


Figure 42: Représentation graphique de la relation entre la moyenne et de la variance de la taille de la portée pour 30 races ovines sans prise en compte des cinq races porteuses d'une mutation identifiée dans les gènes *Fec*.

Chaque point correspond à une des 30 populations analysées. La ligne en pointillés est la courbe de régression polynomiale d'ordre 2 modélisant la relation moyenne/variance de la taille de portée pour l'ensemble des 30 races ( $r^2=0,98$ ). Le point orange représente la race Ile de France.

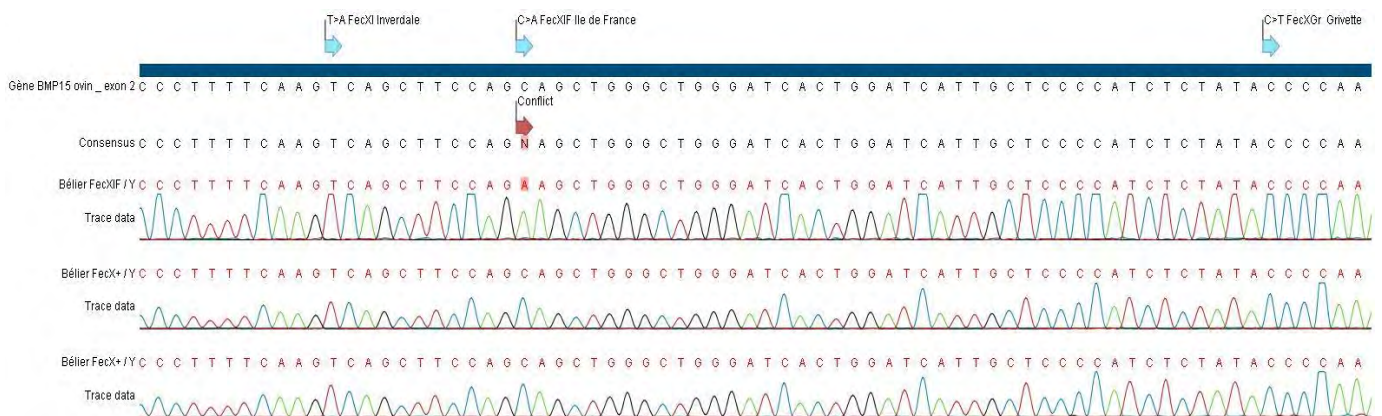


Figure 43: Chromatogramme de séquençage visualisant la mutation c.907 C>A (*FecXIF*) dans la race Ile-de-France.

Les bases nucléotidique A sont représentées en vert, C en bleu, G en noir et T en rouge. Le conflit dans l'alignement des séquences des béliers Ile de France indique la position du SNP C>A créant la mutation *FecXIF* entre les mutations, *FecX<sup>I</sup>* et *FecX<sup>Gr</sup>*.

## B. Population Ile-de-France

Comme énoncé dans la partie introductive de cette thèse, Loys Bodin (INRA GenPhySE) avait émis l'hypothèse de la ségrégation d'un gène majeur dans la race Ile-de-France. Dans la Figure 42, j'ai retiré de la relation entre la prolificité moyenne et la variance, les cinq races pour lesquelles un gène majeur de prolificité ségrége. De ce fait, la relation polynomiale d'ordre 2 est améliorée ( $r^2=0,98$ ). Cependant, la race Ile-de-France (point en orange, moyenne TP = 1,66) suit totalement cette relation contrairement à ce que j'avais observé pour la Noire du Velay et le Mouton Vendéen. Néanmoins, (Souza et al., 2014) ont identifié la mutation de prolificité Vacaria *FecG<sup>V</sup>* dans *GDF9* qui ségrége dans la population Ile de France brésilienne. Ces animaux nés au Brésil sont issus d'insémination artificielle grâce à l'envoi de semence de béliers français. Suite aux échanges avec l'organisme de sélection de la race (OSON, <http://www.mouton-ile-de-france.com>), ils ont pu identifier des animaux contemporains de cette époque (ou bien des apparentés) ainsi que des béliers dont l'index sur la prolificité était améliorateur pour la race. Dès lors qu'un index est positif (maximum à 1), il est supposé améliorer le caractère.

Afin de rechercher la mutation *FecG<sup>V</sup>*, nous avons reçu des paillettes de semence de 23 béliers, dont 6 béliers contemporains des exportations au Brésil. Ces mâles sont nés entre 1988 et 2012, avec des index de prolificité entre +0,079 et +0,402. Au total, ils ont eu 3299 filles (en moyenne, 143 filles/bélier) qui, sur œstrus naturel, présentent une taille de portée moyenne de 1,84 ; supérieure à celle de la race (1,66). Nous avons extrait l'ADN génomique des spermatozoïdes contenus dans les paillettes et réalisé un génotypage par séquençage Sanger (PE 2) de l'exon 2 de *GDF9* dans lequel se trouve *FecG<sup>V</sup>*. Aucun des béliers n'était porteur de la mutation *FecG<sup>V</sup>*. J'ai pu seulement mettre en évidence les polymorphismes G2, G3, G4, G5 et G6 précédemment décrits dans *GDF9* mais sans influence sur la prolificité (Hanrahan et al., 2004). L'exon 1 de *GDF9* a également été séquencé, mais aucun polymorphisme n'a pu être mis en évidence. Devant ce résultat négatif pour la recherche de *FecG<sup>V</sup>*, et toujours dans la stratégie de l'approche gène candidat, j'ai séquencé l'exon 2 du gène *BMP15*, pour 5 des béliers présentant les plus forts index de prolificité (+0,268 à +0,402). J'ai choisi l'exon 2 de *BMP15* car il concentre la presque totalité des mutations *FecX* affectant la prolificité, à l'exception de la mutation *FecX<sup>Bar</sup>*. Deux d'entre eux (index = +0,402 et +0,273) sont porteurs d'un SNP c.907 C>A (Figure 43) induisant sur la protéine une substitution non- conservative (p.Q303K) qui change une glutamine (polaire et non chargée) en lysine (polaire et chargée positivement). Cette mutation, dans une séquence conservée entre espèces,

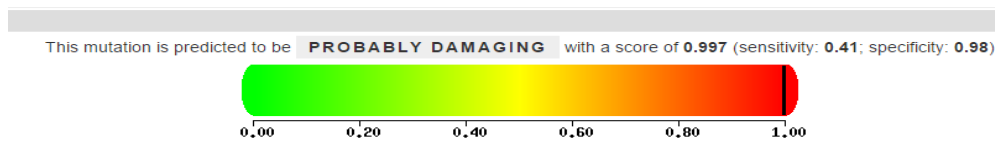


Figure 44: Représentation de l'effet probable de la mutation p.Q303K en race Ile de France sous PolyPhen-2.

Le curseur noir indique la force de l'effet de dommage présumé sur la fonction de la protéine pour le SNP, évalué à l'aide du prédicteur HumDiv.

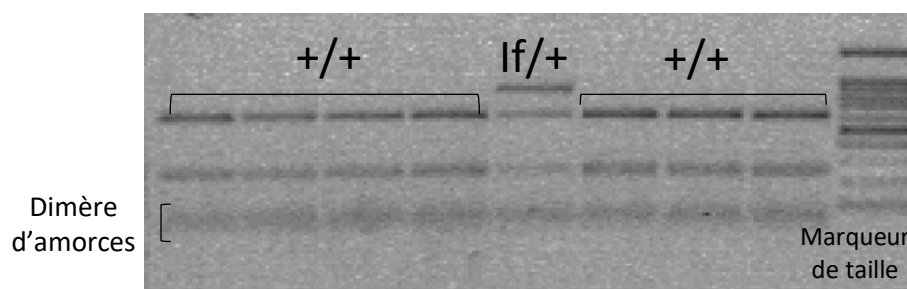


Figure 45: Résultats d'une PCR-RLFP pour la mutation  $FecX^{If}$  en race Ile-de-France.

Après migration électrophorétique sur gel d'agarose, la PCR spécifique pour génotyper la mutation  $FecX^{If}$  génère un fragment de 868 paires de base (pb). La restriction par l'enzyme Pvu2 produit 2 bandes, l'une de 616 pb et l'autre de 252 pb et signe le génotype +/+. Le SNP c. 907 C>A fait disparaître le site de clivage par Pvu2. Ainsi une brebis hétérozygote If/+ apparaît avec 3 bandes : 868 pb, 616 pb et 252 pb.

Tableau 11 : Tableau de contingence des génotypes pour la mutation  $FecX^{If}$  en race Ile-de-France.

Génotype	Effectifs	Prolificité ON
<b>+/+</b>	355	1,55
<b>If/+</b>	20	1,68
<b>?/?</b>	204586	1,56
<b>Total général</b>	<b>204961</b>	<b>1,56</b>

?/? : Le génotype des brebis est inconnu mais il existe des enregistrements de taille de portée pour ces animaux  
 ON : œstrus naturel

est prédite avec une forte probabilité d'altération de la fonction de BMP15 par l'outil bioinformatique PolyPhen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Adzhubei et al., 2010 ; Figure 44). Ce même outil de prédiction fonctionnel rend le même type de résultat avec toutes les mutations *FecX* déjà connues et induisant une substitution. Nous avons nommé l'allèle variant A de ce polymorphisme *FecX<sup>lf</sup>*, en référence à la nomenclature utilisée pour les autres mutations.

À la suite de cette observation, j'ai développé un test de génotypage par PCR-RFLP (PE 3), utilisant l'enzyme de restriction Pvu2 qui ne clive pas la forme mutée, afin de déterminer le génotype des autres béliers (Figure 45). Au final, deux autres béliers sont porteurs hémizygotés de l'allèle *FecX<sup>lf</sup>* (index des béliers = 0,186 et 0,166), portant à 4 le nombre de béliers porteurs parmi les 23 analysés.

La caractéristique d'une mutation portée par le chromosome X d'un mâle, c'est qu'elle est transférée à toutes ses filles. Ainsi par le génotypage des mâles reproducteurs d'un schéma de sélection, on peut par déduction obtenir le génotype des filles à associer avec leur performance de prolificité. Ainsi, un premier lot de 79 mâles Ile-de-France du haras de béliers du centre d'insémination artificielle (CIA) de Verdilly ont été génotypés pour *FecX<sup>lf</sup>*. Six béliers sont avérés porteurs. Les 6 mâles mutés ont eu au total 1518 agneaux et 1510 agnelles. Parmi les agnelles, 798 ont été gardées pour le renouvellement et ont des enregistrements de mises bas dans la base de données OVALL. La moyenne de prolificité brute des agnelles déduite hétérozygotes est de 1,89 alors que la moyenne de la race Ile de France est de 1,66 agneau par mise bas, soit un effet brut potentiel de la mutation de +0,23 agneau par mise bas. Cette première analyse tend à indiquer que *FecX<sup>lf</sup>* est bien une mutation associée à une augmentation de prolificité chez les brebis Ile de France. Par la suite, dans le but de mieux estimer la fréquence et l'effet de *FecX<sup>lf</sup>* sur la prolificité, j'ai cherché à génotyper une cohorte de renouvellement, comprenant des agnelles de l'année et des antenaises (nom donné aux agnelles du millésime précédant). Au final, j'ai pu avoir accès à 531 échantillons de sang dans 11 élevages différents (entre 29 et 73 brebis par élevage). Suite au génotypage, j'ai identifié 26 hétérozygotes *FecX<sup>lf</sup>/FecX<sup>+</sup>* soit 4,9% de porteuses. Ces femelles étant très jeunes, seulement 375 d'entre elles ont eu au moins une portée enregistrée dans OVALL. La moyenne de prolificité sur œstrus naturel est de 1,56 tout génotype confondu pour ces brebis. L'effet brut de la mutation est estimé à +0,13 agneau à l'état hétérozygote (Tableau 11). Je n'ai pas identifié de femelles homozygotes dans notre échantillonnage, ce qui ne nous permet pas de conclure sur une possible stérilité induite par la mutation à l'état homozygote, comme observé avec de nombreuses mutations dans *BMP15*.





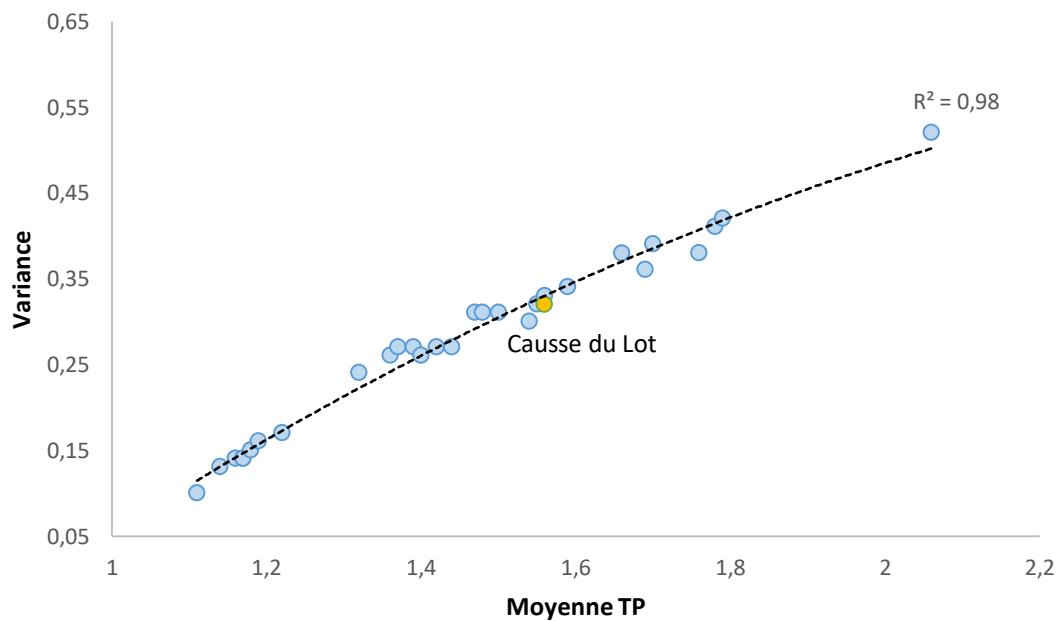


Figure 46: Représentation graphique de la relation entre la moyenne et de la variance de la taille de la portée pour 30 races ovines sans prise en compte des cinq races porteuses d'une mutation identifiée dans les gènes Fec.

Chaque point correspond à une des 30 populations analysées. La ligne en pointillés est la courbe de régression polynomiale d'ordre 2 modélisant la relation moyenne/variance de la taille de portée pour l'ensemble des 30 races ( $r^2=0,98$ ). Le point jaune représente la race Cause du lot.

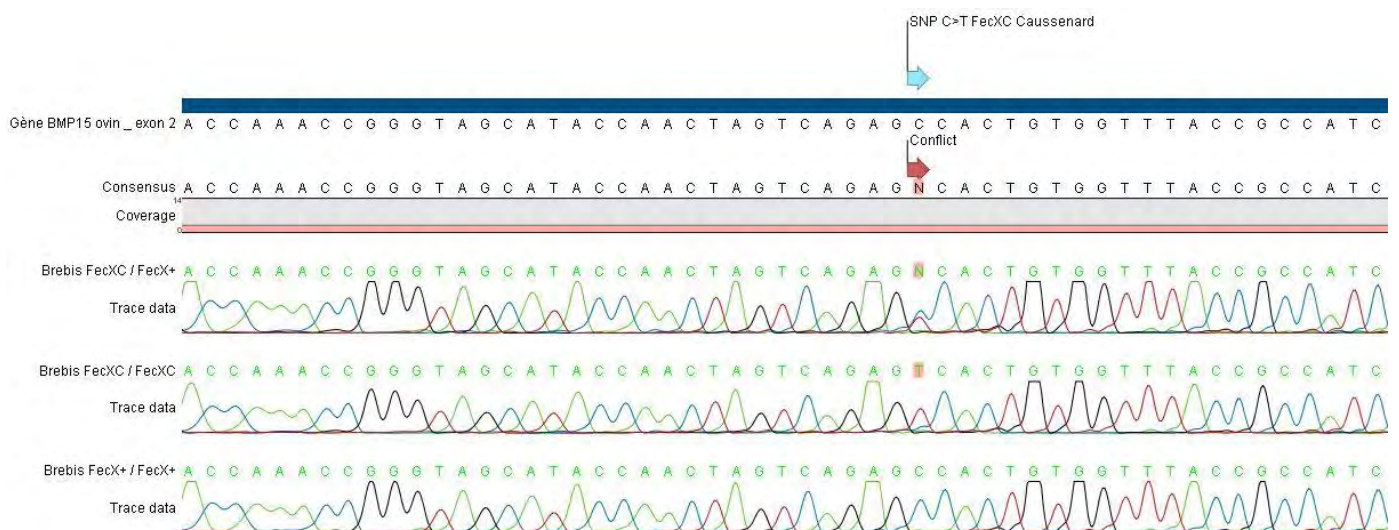


Figure 47: Chromatogramme du séquençage de la mutation c.395 C>T ( $FecX^C$ ) dans la race Cause du Lot.

Les bases nucléotidique A sont représentées en vert, C en bleu, G en noir et T en rouge. Le conflit dans l'alignement des séquences des brebis Cause du Lot indique la position du SNP C>T créant la mutation  $FecX^C$ .

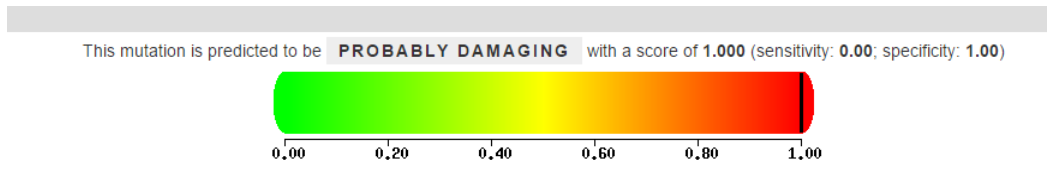


Figure 48: Représentation de l'effet probable de la mutation *p. A132V* en race Cause du Lot sous PolyPhen 2.

Le curseur noir indique la force de l'effet de dommage présumé sur la fonction de la protéine pour le SNP, évalué à l'aide du prédicteur HumDiv.

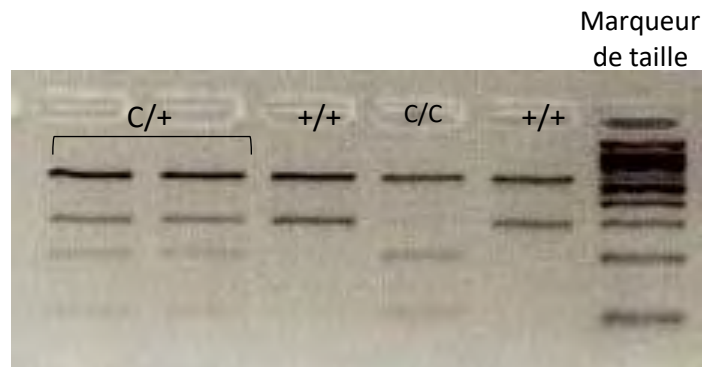


Figure 49: Résultats du génotypage de la mutation *FecX<sup>C</sup>* par PCR-RFLP par l'enzyme *HinfI*.

La PCR-RFLP spécifique pour génotype la mutation *FecX<sup>f</sup>* donne un fragment de 868 paires de base (pb). Le SNP c. 395 C>T fait apparaître le site de restriction de l'enzyme *HinfI*. Le génotype sauvage *+/+* se déduit en présence de 3 bandes de 289 pb, 553 pb et 26 pb (non visible). Le génotype homozygote mutant se déduit en présence 4 bandes de 553 pb, 190 pb, de 99 pb, et de 26 pb (non visible). Une brebis hétérozygote présente 5 bandes : 553 pb, 289 pb, 190 pb, 99 bp et 26 pb (non visible).

De nouveau par l'approche gène candidat, j'ai pu identifier une nouvelle mutation dans *BMP15* à effet sur la prolificité de la population Ile-de-France. Cependant, devant la faible fréquence et l'effet relativement faible de l'allèle *FecX<sup>f</sup>*, il n'est pas certain que cette mutation soit à elle seule la réponse à l'hypothèse initiale de ségrégation d'une mutation à effet majeur dans cette population.

### C. Population Causse du Lot

Parallèlement à la recherche du gène majeur en race Ile-de-France, je me suis intéressée à la race Causse du Lot. Comme l'Ile-de-France, la race Causse du Lot ne se démarque pas des autres races dans la relation moyenne/variance de la taille de portée avec une prolificité moyenne de 1,56 agneau par mise bas sur œstrus naturel (Figure 46). Cependant, d'après la Figure 38 (page 94), cette race a connu une forte augmentation de sa prolificité moyenne ces 30 dernières années de la même manière que les races Noire du Velay, Grivette ou Lacaune. Grâce à un projet antérieur à cette thèse, DEGERAM (DEveloppement de la GENomique pour les RAcés de Massif) porté par le CORAM (COLlectif des RAcés locales de Massif) et comportant une action pour les gènes majeurs de prolificité ovine, j'ai pu avoir accès à des échantillons sanguins de brebis Causse du Lot hautement prolifiques (n=118 ; moyenne de prolificité =2,38 [1,8-4,0]).

L'approche de génotypage spécifique des mutations candidates *FecX<sup>L</sup>*, *FecX<sup>Gr</sup>*, *FecL<sup>L</sup>*, *FecB<sup>B</sup>* et également *FecX<sup>f</sup>*, ne m'a pas permis d'observer leur ségrégation dans la race Causse du Lot. J'ai donc choisi de passer à l'approche gène candidat par le séquençage Sanger (PE 2) des deux exons des gènes *BMP15* et *GDF9*, réalisé sur 11 des brebis les plus prolifiques ayant eu au moins 3 portées avec 2 fois des portées triples sur œstrus naturel. L'analyse des séquences n'a pas révélé de nouveaux polymorphismes dans *GDF9*, mais a mené à l'identification d'un nouveau polymorphisme chez 4 d'entre elles (3 hétérozygotes et une homozygote) dans l'exon 2 de *BMP15* (Figure 47). Il s'agit d'un SNP C>T en position 395 de l'ADNc du gène *BMP15* menant au changement p.A132V sur la protéine correspondant à une substitution d'une alanine par une valine, deux acides aminés à chaîne latérale hydrophobe proches en structure. Cependant, cette substitution dans une région conservée entre espèces, est prédite avec une forte probabilité d'altération de la fonction de *BMP15* par l'outil bioinformatique PolyPhen-2 (Figure 48). J'ai nommé ce nouvel allèle de *BMP15*, *FecX<sup>C</sup>*. Tout comme pour la mutation *FecX<sup>f</sup>*, j'ai développé un test de génotypage par PCR-RFLP (PE 3), utilisant l'enzyme de restriction Hinf1 qui clive en présence de l'allèle *FecX<sup>C</sup>* (Figure 49). À l'aide de ce test, j'ai réalisé le génotypage des 118 brebis du projet DEGERAM au locus *FecX<sup>C</sup>*.

Tableau 12 : Tableau de contingence pour la mutation *FecX<sup>C</sup>* en race Causse du Lot (échantillons DEGERAM).

Génotype <i>FecX<sup>C</sup></i>	Effectifs	Prolificité ON
<b>+/+</b>	100	2,38
<b>+/C</b>	16	2,39
<b>C/C</b>	2	2,55
<b>Total général</b>	<b>118</b>	<b>2,38</b>

ON : œstrus naturel

Tableau 13 : Tableau de contingence pour la mutation *FecX<sup>C</sup>* en race Causse du Lot (population).

Groupe/génotype <i>FecX<sup>C</sup></i>	Effectifs	Prolificité ON
Basse		
<b>+/+</b>	29	1,09
<b>C/+</b>	2	1,00
Haute		
<b>+/+</b>	21	2,68
<b>C/+</b>	3	2,61
<b>C/C</b>	1	2,50
<b>Total général</b>	<b>56</b>	<b>1,79</b>

ON : œstrus naturel

Parmi l'ensemble de ces brebis, 16 d'entre-elles sont hétérozygotes et 2 sont homozygotes *FecX<sup>C</sup>/FecX<sup>C</sup>* (Tableau 12).

Lorsque l'on observe la prolificité en fonction du génotype de ces brebis, on peut voir que deux brebis homozygotes *FecXC/FecXC* sont prolifiques (TP=2,55) et donc fertiles, et que les brebis hétérozygotes présentent une prolificité de 2,41 identique aux brebis non porteuses de l'allèle *FecXC*. D'après cette première analyse, il semblerait que l'allèle *FecXC* ne soit pas associé à une augmentation de la prolificité dans la race Cause du Lot. Cependant, l'analyse est biaisée par l'échantillonnage de brebis uniquement hautement prolifique. Pour tenter de remédier à cela et en coopération avec l'organisme de sélection OVILOT (<http://www.capel.fr/nos-activites/pole-animal/ovins/ovilot>), 2 séries d'échantillonnages ont été organisées pour collecter d'une part du sang des mâles du haras de béliers du CIA (n=52) et d'autre part des brebis faiblement prolifiques (n=31, TP moyenne=1,09) et fortement prolifiques (n=25, TP moyenne=2,48) de façon à visualiser dans quel groupe ségrége plus fréquemment l'allèle *FecXC* (Tableau 13). Au final, *FecX<sup>C</sup>* est retrouvé chez 2 béliers qui ont eu chacun 57 filles à minima hétérozygotes, mais qui n'ont pas encore suffisamment de performances dans OVALL pour conclure sur un effet potentiel de l'allèle. Parmi les brebis génotypées pour *FecX<sup>C</sup>*, seulement quatre sont porteuses de l'allèle dans le groupe des 25 hautement prolifique (16%), dont une homozygote, et deux sont hétérozygotes dans le groupe des faiblement prolifique (6%, Tableau 13). Cependant cette différence de fréquence entre les deux groupes n'est pas significative (p=0,39, test exact de Fischer). Si l'on regarde la prolificité moyenne par génotype dans cet échantillonnage, là encore les brebis porteuses de *FecX<sup>C</sup>* ne présentent pas d'augmentation significative de la taille de portée (p=0,95).

Dans la race Cause du Lot, par l'approche gène candidat, j'ai pu identifier un nouveau polymorphisme de type SNP dans *BMP15* (c.395C>T, *FecX<sup>C</sup>*) chez des brebis hautement prolifiques, mais qui au vu des résultats préliminaires obtenus ne semble pas causale d'une variabilité de la prolificité dans cette race.



## D. Population Mouton Flemish - Belgique

Dans le cadre d'une collaboration franco-belge (Université de Louvain), j'ai eu l'opportunité de travailler sur la race Flemish. Cette race laitière belge à petits effectifs (présente aussi aux Pays-Bas, race Vlaams) est connue pour ses portées multiples et il n'est pas rare d'observer entre 3 et 5 agneaux par mise bas. Elle est à l'origine, avec la race Texel, de la race composite Swifter, elle aussi prolifique (TP=1,85 ; <http://www.swifter.be/en/swifterra.htm>). Entre 2002 et 2015, la prolificité moyenne de la race a atteint  $2,02 \pm 0,75$  agneaux par mise bas. Dans le but de supporter les efforts de conservation de la population, les données de pédigrée (n=5095), et de taille de portée de 1224 brebis ont été analysées par R. Mayermans et S. Janssens. L'héritabilité du caractère prolifique s'est avérée relativement haute ( $h^2=0,25$ ) dans cette race, comparée aux données de la littérature qui estime cette héritabilité vers 0,1 (Bradford, 1985), laissant présager la présence d'une mutation à effet majeur. J'ai tout d'abord eu accès aux échantillons sanguins de 5 femelles hautement prolifiques et 1 mâle. Toujours sur la base de l'approche gène candidat, j'ai séquencé les deux exons des gènes *BMP15* et *GDF9*. J'ai ainsi découvert que la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* dans *BMP15* (Demars et al., 2013) était présente chez trois des femelles.

Dans un second temps, j'ai reçu 58 échantillons (20 béliers et 38 brebis) afin de valider la ségrégation de la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* dans cette population. J'ai réalisé ces génotypages par une approche d'amplification allèle spécifique PCR-KASPAR, préalablement développée au laboratoire (PE 1). Quatre individus (1 mâle et 3 femelles) sont porteurs de la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* dans le gène *BMP15*, soit une fréquence de 6,9% dans cet échantillon.

Cette découverte préliminaire qui a donné lieu à une présentation affichée au congrès EEAP 2017 (document en annexe), justifie une recherche plus large de la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* à l'échelle de la population et une estimation de ses effets sur la prolificité de la race Flemish. Cela souligne également l'importance de la conservation et de l'étude des races en voie de disparition, car elles peuvent héberger des allèles précieux pour une utilisation future.

Tableau 14 : Effectifs des animaux séquencés tout génome par race.

<b>Race</b>	<b>Effectifs</b>
Belclare	2
Berrichon du Cher	3
Black Belly	1
Cambridge	7
Charollais	1
Lacaune	31
Noire du Velay	3
Romane	4
Romanov	2
ROM x BB	5
Suffolk	2
Texel	2
Vendéen	5



## E. Population Martinik Black Belly

Avant cette thèse et au cours de celle-ci, de nombreuses données ovines de séquençages tout génome ont été rendues disponibles publiquement ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Il existe deux grands projets internationaux qui visent à réaliser et à collecter des données de séquence tout génome chez les ovins. Le premier est celui du consortium international du génome ovin (ISGC ; <https://www.sheepmap.org/>) qui met à disposition pas moins de 451 génomes de 39 races différentes. Le second projet est un projet européen dans le domaine de la conservation et la diversité génétique (NextGen ; <https://www.epfl.ch/labs/nextgen/>) qui a généré le séquençage de 180 génomes ovins provenant d'animaux originaires d'Iran et du Maroc. L'exploration des bases de variants génomiques issus de ces données permet de repérer, entre autres, ceux présents dans les gènes connus pour leur implication dans le contrôle de la prolificité. Cette approche a été utilisée avec succès dans mon équipe d'accueil, permettant l'identification de la présence de la mutation *FecL<sup>L</sup>* dans une race prolifique d'Afrique du Nord, la D'man, grâce aux données disponibles dans la base de données d'Ensembl (Ben Jemaa et al., 2018).

### 1) Mise en évidence de la mutation

De plus, au sein de mon équipe d'accueil, en lien avec des besoins pour répondre à des questionnements scientifiques sur le déterminisme génétique de caractères en relation avec la santé, la qualité du lait, la robustesse ou encore l'adaptation aux conditions climatiques chez les ovins, un ensemble de 68 animaux, de 13 races différentes (Tableau 14), ont été séquencés à l'aide de la technologie HiSeq (Illumina) sur la plateforme Genotoul-GeT (INRA Toulouse, <https://get.genotoul.fr>). Après alignement sur la version v4.0 du génome ovin, les fichiers de variants (SNP et InDels) ont été mis à disposition par P. Bardou (équipe Sigene, GenPhySE, INRA de Toulouse). De façon similaire à l'approche menée par Jemaa et al. (2018), j'ai recherché les mutations identifiées dans les quatre gènes majeurs de prolificité que sont *BMPR1B*, *BMP15*, *GDF9* et *B4GALNT2*. Finalement, un unique animal s'est avéré porteur d'une mutation connue. Il s'agit du seul représentant de la race Martinik Black Belly qui est hétérozygote pour la mutation *FecG<sup>E</sup>* dans le gène *GDF9* (OAR5\_v4.0 g.41768445A>C) (Silva et al., 2014). Initialement, la découverte de cette mutation a été réalisée dans la population Santa Inês au Brésil. La première suspicion de la ségrégation d'un gène majeur en race Black Belly, connue pour être une race créole prolifique, remonte à la fin des années 80 par (Mahieu et al., 1989).

Tableau 15 : Fréquence et effet de la mutation *FecG<sup>E</sup>* dans la population Martinik Black Belly de la station expérimentale de l'INRA.

Génotype	Nombre bélier	Nombres brebis	Fréquence	Prolificité
+/+	12	24	2,4%	1,49 (n=15)
E/+	21	59	54,7%	1,74 (n=32)
E/E	11	20	20,9%	2,04 (n=12)

## 2) Fréquence et effet de *FecG<sup>E</sup>*

Afin de valider la présence de la mutation, j'ai développé un test de génotypage par PCR-RFLP forcée utilisant l'enzyme de restriction *XmnI* (PE 3). J'ai pu avoir accès à 147 échantillons sanguins de moutons Black Belly (103 brebis et 44 béliers), présents au domaine de La Sapinière à Bourges, une unité expérimentale du centre INRA Val de Loire. Parmi l'ensemble des animaux, 79 brebis (59 hétérozygotes, 20 homozygotes), et 32 béliers (21 hétérozygotes, 11 homozygotes) sont porteurs de la mutation *FecG<sup>E</sup>*, soit 75% des individus de cet échantillonnage.

Sur les 103 brebis, je disposai d'au moins un enregistrement de mise-bas pour 61 d'entre-elles (taille de portée moyenne : 1,68). L'effet brut de la mutation sur la taille de portée est compris entre +0,25 à +0,3 agneau par mise-bas par copie de l'allèle (Tableau 15) pour cette population expérimentale. Comme pour la population Santa Inès au Brésil, les brebis Black Belly homozygotes *FecG<sup>E</sup>/FecG<sup>E</sup>* ont toutes des enregistrements de mise bas, confirmant que la mutation n'entraîne pas de stérilité. De façon à mieux estimer la fréquence et l'effet de *FecG<sup>E</sup>* dans une population commerciale plus large, nous avons lancé une collaboration avec l'unité de recherches zootechniques de l'INRA Antilles-Guyane afin de prendre les contacts avec l'organisme de sélection en charge de cette race. Par cette approche opportuniste tirant partie des données générées à d'autres fins scientifiques, j'ai identifié pour la première fois une mutation connue de prolificité dans *GDF9* ségrégant dans une race française.

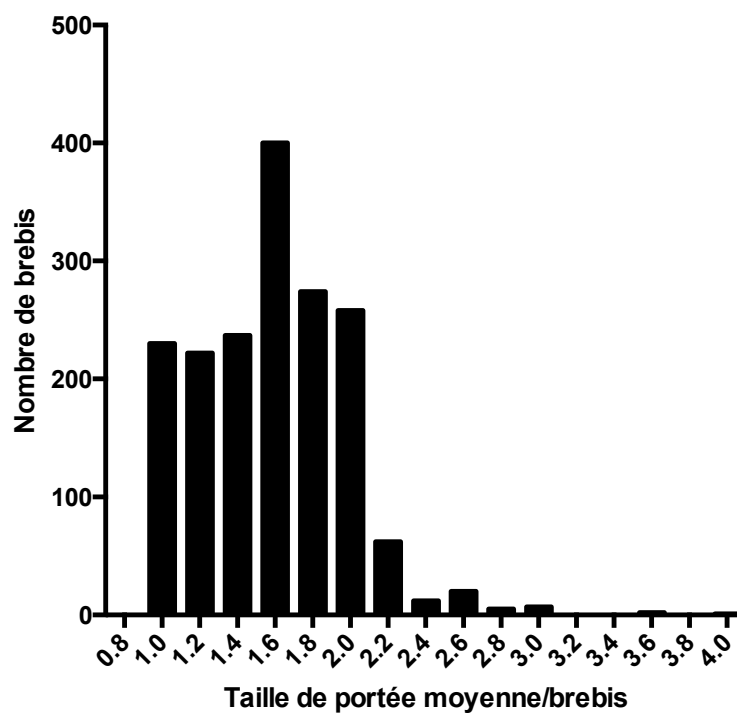


Figure 50: Distribution de la taille de portée des brebis Noire du Velay non porteuses de la mutation Fecl<sup>L</sup>.

Tableau 16: Observations des tailles de portée chez des brebis Noire du Velay porteuses ou non de la mutation Fecl<sup>L</sup>.

ego	Fecl	MBon	AGXon	PRon	tp1	tp2	tp3	tp4	tp5	tp6	tp7	tp8	tp9	tp10	tp11	tp12
32533600011	++	9	32	3.56	3	3	2	4	5	2	6	3	4	.	.	.
32995080071	++	8	24	3.00	3	3	2	3	4	1	4	4	.	.	.	.
32561980007	++	8	23	2.88	2	2	3	3	3	3	5	2	.	.	.	.
32513361004	++	12	30	2.50	1	2	2	3	3	2	3	2	2	3	4	3
32528370069	LL	6	18	3.00	2	4	2	2	5	3	.	.	.	.	.	.
32561780069	LL	11	24	2.18	3	3	3	2	1	2	1	3	3	1	2	.
32528330159	LL	5	10	2.00	1	1	2	4	2	.	.	.	.	.	.	.

Surligné en rouge, les tailles de portées supérieures ou égale à 3. MBon : nombre de mise bas sur œstrus naturel ; AGXon ; nombre d'agneaux nés sur œstrus naturel ; PRon : Prolificité sur œstrus naturel.

## II. Approche globale sans *a priori*

### A. Populations Noire du Velay et Blanche du Massif Central

À la suite de la découverte de la mutation *FecL<sup>L</sup>* dans la population Noire du Velay et au génotypage de plus de 2700 brebis à ce locus, nous avons observé un grand nombre de brebis hyperprolififiques non porteuses de cette mutation (20% avec une prolificité  $\geq 2,00$  pour une moyenne à 1,58 ; Figure 50). Certaines présentent même des performances équivalentes aux brebis homozygotes pour *FecL<sup>L</sup>* avec des tailles de portée régulièrement  $\geq 3$  (Tableau 16), qui laisserait penser qu'une seconde mutation de prolificité dans cette population puisse expliquer ces phénotypes extrêmes. Grâce aux recherches précédentes, nous savons que dans une même race il est possible que plusieurs gènes majeurs soient présents comme c'est le cas dans la race Lacaune avec les mutations *FecL<sup>L</sup>* et *FecX<sup>L</sup>* (Bodin et al., 2007; Drouilhet et al., 2013), ou bien dans la race Belclare avec *FecX<sup>B</sup>* et *FecG<sup>H</sup>* (Hanrahan, 1991; 2004).

#### 1) Analyse génétique génome complet

Comme indiqué précédemment, j'avais vérifié qu'aucune autre mutation de gènes *Fec* connue en France ne ségrégait en Noire du Velay, que ce soit par des tests de génotypage spécifique, ou des séquençages des parties codantes de *BMP15* et *GDF9* (Article 1 ; Chantepie et al., 2018). N'ayant plus d'a priori, j'ai donc choisi de réaliser une approche tout génome par analyse d'association (GWAS, PE 4) du phénotype prolifique et d'information de génotypes issus de la puce Ovine SNP50K BeadChip d'Illumina. Pour cette étude, nous avons décidé de conduire une analyse d'association de type cas/contrôle comme celle réalisée avec succès au laboratoire pour la découverte de la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* en race Grivette (Demars et al., 2013). Parmi les brebis Noire du Velay, génotypées au locus *FecL* et non porteuses de *FecL<sup>L</sup>*, j'ai sélectionné deux groupes de brebis ayant au moins des enregistrements pour 5 mises-bas sur œstrus naturel afin d'assurer le phénotype (moyenne de prolificité globale = 1,84 ; [1,00-3,50]). Le groupe « cas » comprenait 40 brebis hautement prolifiques avec une moyenne de prolificité de 2,47 alors que le groupe « contrôle », comprenait 40 brebis peu prolifiques avec une moyenne de prolificité de 1,23. Les 80 brebis ont été génotypées pour les 54 241 SNP de la puce Ovine SNP50K. Les données ont été filtrées et analysées avec le logiciel Plink (Chang et al., 2015) ce qui a permis de réduire le nombre de SNPs informatifs à 47 446 pour 79 animaux (1 brebis n'ayant pas passé les filtres de qualité). L'analyse statistique d'association avec la prolificité, fait apparaître un signal significatif au niveau du chromosome X.

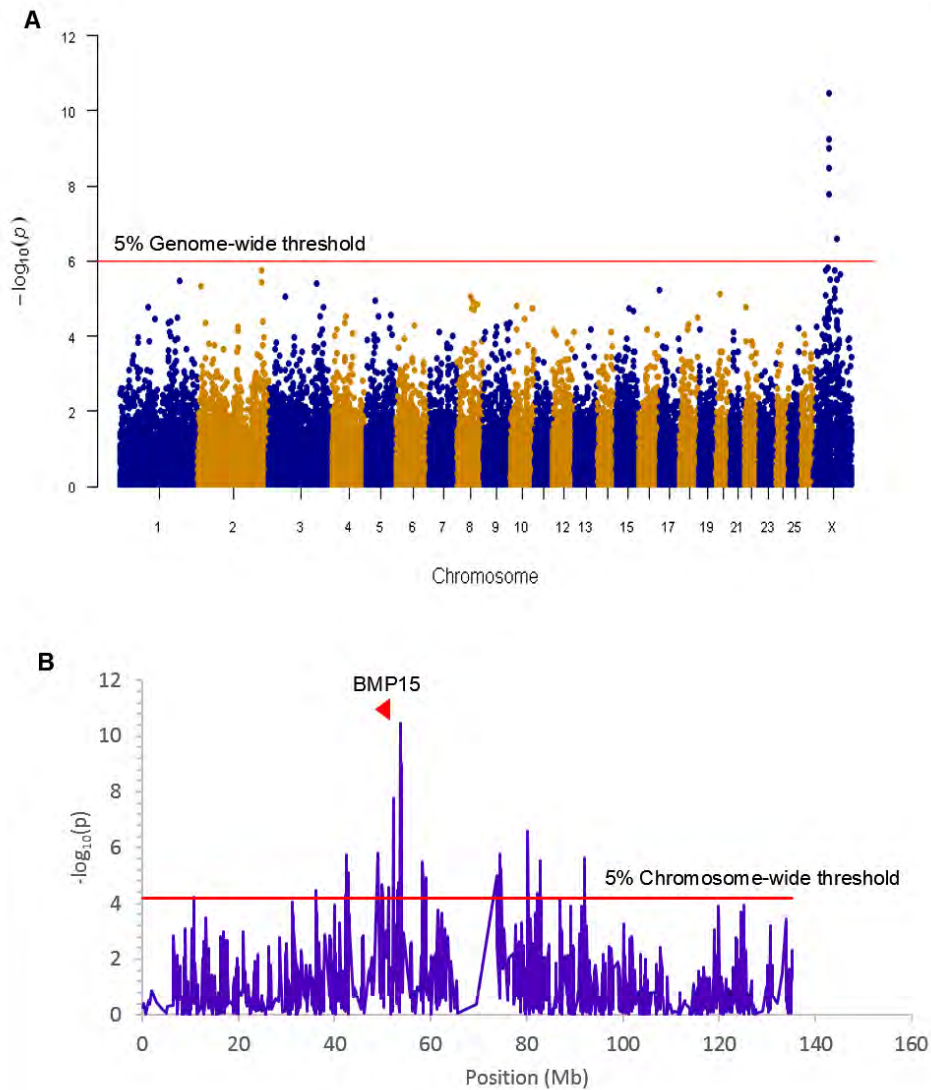


Figure 51: Résultat de l'analyse d'association pour la race Noire du Velay au niveau génomique et chromosomique.

(A) Résultats d'association pangénomique pour la taille de la population de moutons NV. Le graphique Manhattan montre la signalisation combinée ( $-\log_{10}$  (valeur de  $p$ )) sur l'axe des ordonnées par rapport à la position des SNP dans le génome ovin sur l'axe des abscisses et en ordre de numéro de chromosome (assemblage OARv3.1). La ligne rouge représente le seuil de 5% du génome. (B) Résultats d'association à l'échelle du chromosome OARX. La courbe montre l'association de signalisation combinée ( $-\log_{10}$  (valeur de  $p$ )) sur l'axe des y par rapport à la position des SNP sur le chromosome X sur l'axe des x (assemblage OARv3.1). La ligne rouge représente le seuil de 5% du chromosome. La localisation du gène BMP15 est indiquée par une pointe de flèche rouge.

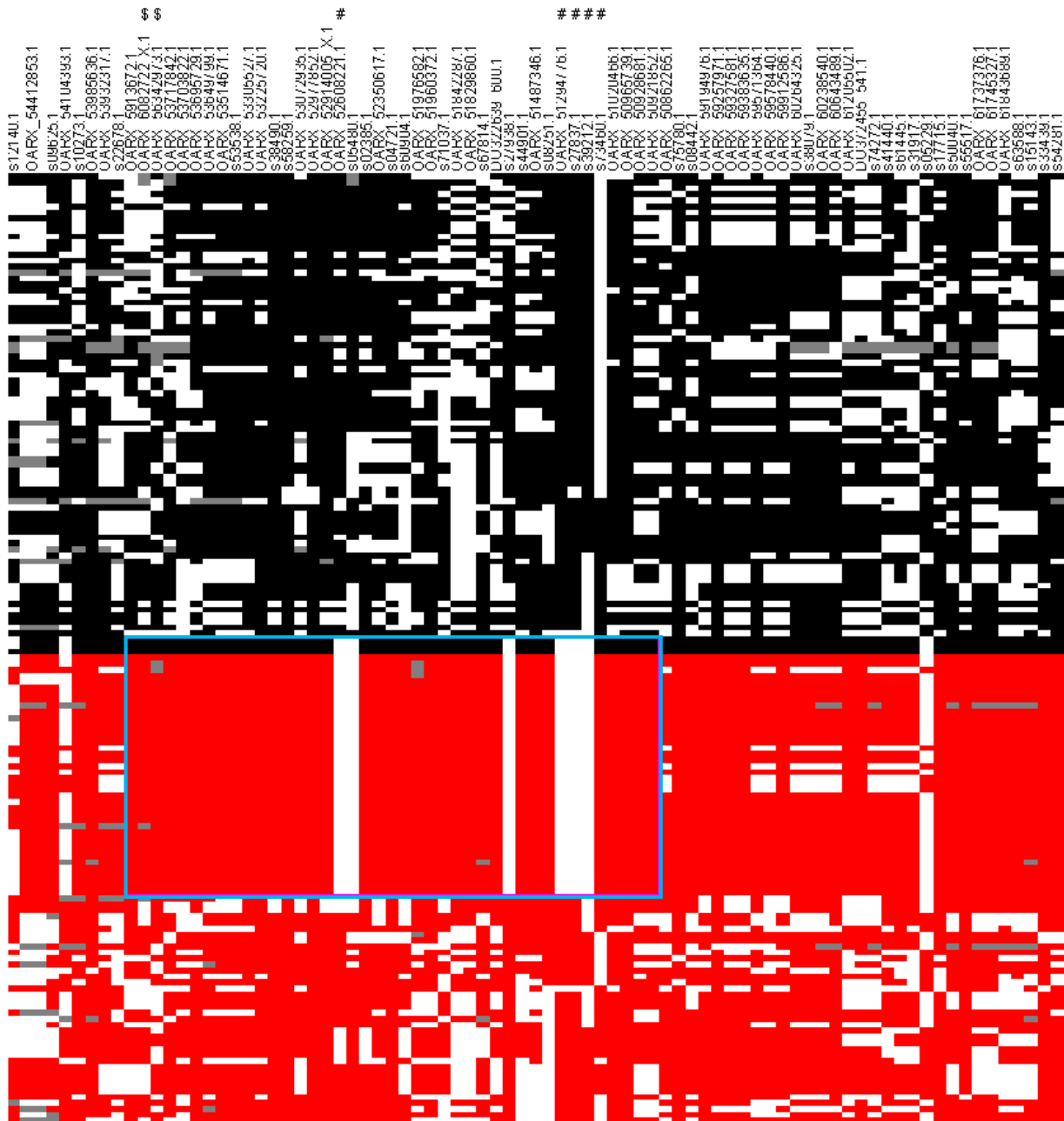


Figure 52: Reconstruction de l'haplotype causal au locus OARX.

80 marqueurs englobant la région d'intérêt OARX (50,6 Mb-54,1 Mb) ont été sélectionnés pour construire des haplotypes. Chaque colonne représente un SNP et chaque ligne représente un haplotype. Pour un marqueur, (i) l'allèle 1 est en noir dans les témoins ou en rouge dans les cas, (ii) l'allèle 2 est en blanc lorsque la phase était non ambiguë et (iii) la couleur grise représente le SNP non phase. Les haplotypes ont été ordonnés pour distinguer les témoins des cas et regroupés pour classer des clades similaires d'haplotypes. Le signe # indique que le SNP est significativement associé à la taille de portée au niveau de l'ensemble du génome. Le signe \$ indique les SNPs flanquants aux gènes *BMP15* (50970938-50977454 bp).

L'haplotype spécifique préférentiellement sélectionné chez les brebis très prolifiques (cas) est symbolisé par le cadre de couleur cyan.

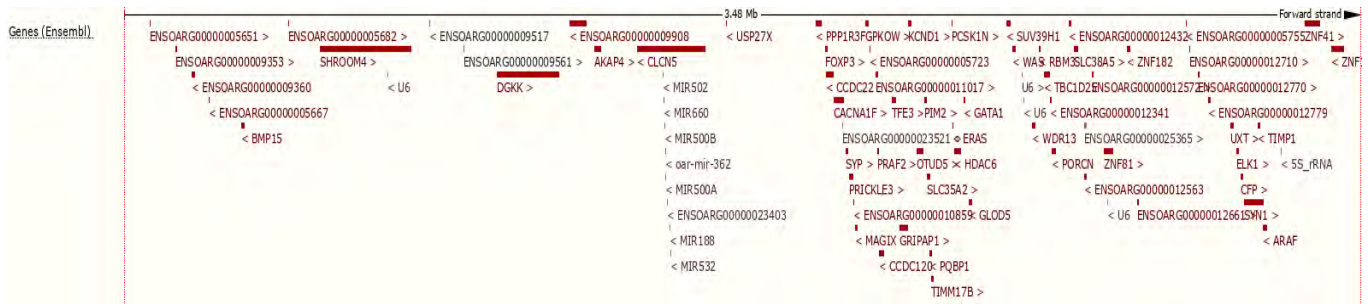


Figure 53: Région de localisation probable de la mutation sur le chromosome X ovin.

Capture d'écran de la région 50639087–54114793 pb du chromosome X ovin (OARV3.1, Ensembl.org) avec les annotations correspondantes à des gènes codant pour des protéines (rouge), des ARN non codants (violet) ou des pseudogènes (bleu).



Plus précisément, 26 marqueurs SNP sont associés au seuil de signification chromosomique et 6 au seuil génomique (Figure 51).

Étonnement, ces marqueurs sont localisés à proximité du gène *BMP15*, qui semblaient pourtant exclu comme gène candidat par rapport à mes analyses précédentes. Afin de mieux caractériser ce locus, j'ai déterminé, pour chaque individu, l'haplotype le plus probable de 80 marqueurs du chromosome X (réparti sur 10 Mégabases, Mb) autour des 6 marqueurs associés au seuil génomique. Les haplotypes ont été reconstruits avec le logiciel FastPhase (Scheet and Stephens, 2006) et classés en fonction des allèles et du groupe d'appartenance des brebis « cas » ou « contrôle » (Figure 52). Cette visualisation permet de repérer les recombinaisons qui cassent les haplotypes de 80 marqueurs et de délimiter la région la plus probable de localisation de la mutation causale en déséquilibre de liaison avec les marqueurs de cette région. Ainsi, j'ai pu identifier une région de 3,5 Mb (entre les positions 50639087–54114793 pb du chromosome X, en référence à la version OARv3.1 du génome ovin) et qui comporte le gène *BMP15*. À ce stade de l'étude, *BMP15* était toujours le meilleur gène candidat pour expliquer le déterminisme génétique de la prolificité chez les brebis Noire du Velay non porteuses de *FecL<sup>L</sup>*, mais avec aucune mutation identifiée dans sa séquence codante.

## 2) Caractérisation de la mutation *FecX<sup>N</sup>*

Afin d'identifier la mutation causale, les génomes complets de deux brebis homozygotes pour l'haplotype réduit à la zone de 3,5Mb, une pour sa forme supposée référence/contrôle et l'autre pour sa forme variante/cas ont été séquencés (Illumina HiSeq, PE 5). La recherche de l'ensemble des variants par rapport à la séquence de référence (OARV3.1) via l'outil GATK (DePristo et al., 2011; Van der Auwera et al., 2013) a permis l'identification de 60 SNPs et de 90 petites insertions/délétions (InDels) dans la région causale précédemment délimitée. Sur la base de l'information d'annotation (Figure 53), un seul polymorphisme se trouve dans une séquence traduite, il s'agit d'un SNP dans le gène *PRICKLE3* mais qui ne conduit pas un changement d'acide aminé dans la protéine. Quarante-quatre autres polymorphismes sont situés dans des régions annotées : amont des gènes, exons, introns, accepteurs ou donneurs d'épissage et aval des gènes. Soixante-cinq polymorphismes se trouvent dans des régions intergéniques. Parmi les polymorphismes des régions annotées, j'ai pu identifier un SNP (g.50977717T>A, OARX v3.1) situé à 290pb en amont du codon initiateur de la traduction du gène *BMP15*, comme possible mutation candidate. La localisation de ce SNP en amont de *BMP15* explique le fait que je ne l'ai jamais détecté dans les séquençages Sanger de *BMP15* qui étaient ciblés sur les séquences codantes.



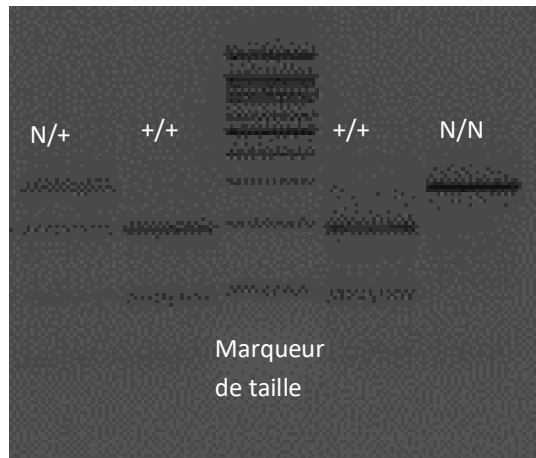


Figure 54: Résultats d'un test de génotypage de  $FecX^N$  par PCR-RFLP.

La PCR-RFLP spécifique pour génotyper la mutation  $FecX^N$  génère un fragment de 341 paires de base (pb). Le SNP c.-290 T>A fait disparaître le site de restriction de l'enzyme MseI. Le génotype sauvage +/+ se déduit en présence de 2 bandes de 190 pb et 90 pb. Le génotype homozygote mutant se déduit en présence d'une bande de 280 pb. Une brebis hétérozygote présente 3 bandes : 280 pb, 190 pb et 90 pb.

Tableau 17 : Répartition du SNP OARX:50977717T>A entre les groupes "cas" et les "contrôle"

Groupe		TT	TA	AA
« contrôle » peu prolifique	n	37	3	
	Moyenne brute TP	1,22	1,39	
« cas » hautement prolifique	n	5	28	6
	Moyenne brute TP	2,41	2,43	2,73
Total		42	31	6

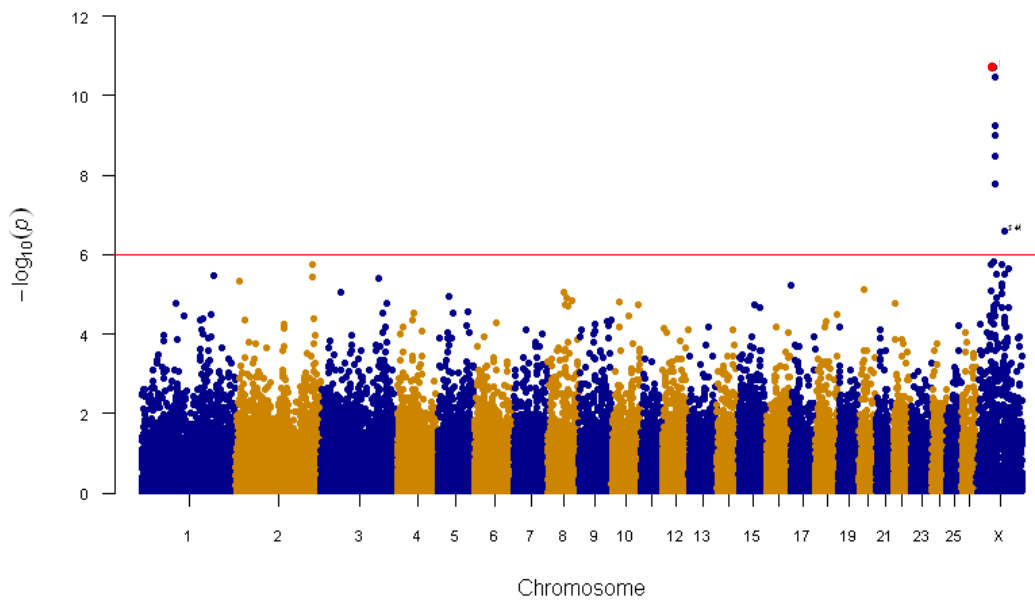


Figure 55: Résultat d'association à l'échelle du génome intégrant le SNP OARX:50977717 T>A.

Résultats d'association à l'échelle du chromosome OARX. La courbe montre l'association de signalisation combinée ( $-\log_{10}$  (valeur de p)) sur l'axe des y par rapport à la position des SNP sur le chromosome X sur l'axe des x (assemblage OARv3.1). La ligne rouge représente le seuil de 5% du chromosome. La localisation du gène BMP15 est indiquée par une pointe de flèche rouge. La ligne rouge représente le seuil de 5% du génome. Le SNP 50977717 T>A est représenté par le point rouge.

Tableau 18: Résultats du génotypage  $FecX^N$  pour les races françaises à partir du panel de diversité.

Breed	Total	Genotype	
		+/+	N/+ (N/Y) <sup>a</sup>
Belle Ile	64	43	21
Berrichon du Cher	29	29	
Blanche du Massif Central	31	27	4
Causse du Lot	32	32	
Charmoise	31	31	
Charollais	29	29	
Corse	30	30	
Ile de France	28	28	
Lacaune (meat)	42	40	2
Lacaune (dairy)	40	40	
Limousine	30	30	
Manech tête rousse	29	29	
Martinik	22	22	
Merinos d'Arles	26	26	
Mourerous	26	26	
Mouton Vendéen	30	30	
Noire du Velay	28	26	2
Préalpes du sud	27	27	
Rava	29	29	
Romane	29	29	
Romanov	26	26	
Rouge de l'Ouest	28	28	
Roussin	30	30	
Suffolk	20	20	
Tarasconnaise	32	32	
Texel	21	21	
<b>TOTAL</b>	<b>725</b>	<b>717</b>	<b>8</b>

J'ai développé un test de génotypage par PCR-RFLP (PE 3) afin de génotyper l'ensemble des brebis du dispositif GWAS. L'allèle A du SNP g.50977717T>A fait apparaître un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction MseI (Figure 54). Parmi le groupe « Cas », 34 sur 39 sont porteuses de la mutation (dont 6 homozygotes) et seulement 3 chez les brebis du groupe « contrôle » (Tableau 17). La ségrégation des allèles de ce SNP est significativement différente entre les deux groupes ( $P < 0,001$ , test exact de Fisher) et la prolificité des brebis porteuses de l'allèle A est significativement plus élevée que celle des non porteuses (T/T=1,36 vs. T/A=2,32 ou A/A=2,73 ;  $P < 0,001$ , ANOVA). De plus lorsque le SNP g.50977717T>A est rajouté à l'analyse GWAS, celui-ci devient le marqueur le plus significativement associé au phénotype de prolificité (Figure 55). Devant ce faisceau d'argument en faveur de la causalité de ce SNP comme mutation pour expliquer le phénotype hyperprolifique des brebis Noire du Velay, l'allèle variant de ce SNP est appelé *FecX<sup>N</sup>*.

Dans le même temps, venant de découvrir une nouvelle mutation, et à l'instar des mutations *FecB<sup>B</sup>*, *FecX<sup>G</sup>*, *FecG<sup>H</sup>*, *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecL<sup>L</sup>* qui peuvent ségréger dans plusieurs populations ovines (Ben Jemaa et al., 2018; Chantepie et al., 2018; Davis et al., 2002; Mullen et al., 2013), j'ai souhaité analyser la présence de *FecX<sup>N</sup>* dans d'autres populations ovines. En première approche, j'ai utilisé un ensemble de 725 échantillons disponibles au laboratoire constituant un « panel de diversité génétique ovine » de 26 races (Rochus et al., 2018) et des échantillons de la race prolifique Belle-Ile (cf la Situation du sujet). Le génotypage PCR-RFLP de *FecX<sup>N</sup>* m'a permis d'observer la ségrégation de la mutation, également en races, Blanche du Massif Central, Lacaune et Belle île (Tableau 18). Je traiterai les résultats en Lacaune et Belle-Ile dans un paragraphe séparé.

Tableau 19 : Fréquence et effet de  $FecX^N$  sur la moyenne brute de prolificité en NV et en BMC.

Génotype	Noire du Velay $FecX$ (n=2323)			Blanche du Massif Central $FecX$ (n=2456)		
	+/+	N/+	N/N	+/+	N/+	N/N
Nombre d'animaux	1839	450	34	1999	432	25
Fréquence (%)	79.2	19.4	1.5	81,3	17.6	1
Moyenne brute TP	1.66	1.93	2.45	1.56	1.79	1.87

TP : taille de portée

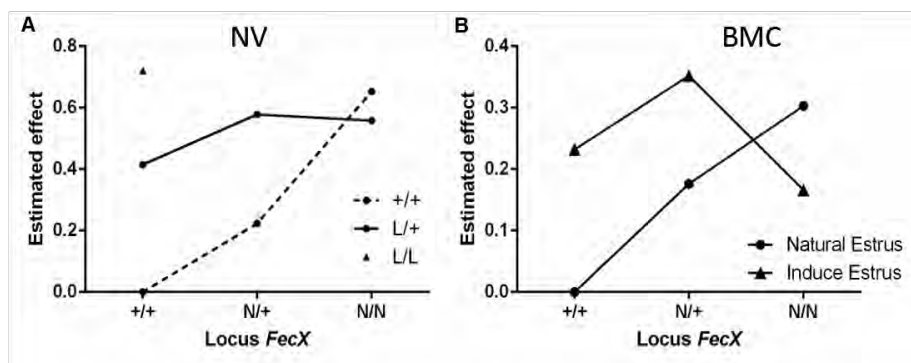


Figure 57: Effet estimé de  $FecX^N$  en race Noire du Velay et Blanche du Massif Central

(A) Effet estimé de  $FecX^N$  sachant le génotype au locus  $FecL$  en Noire du Velay. (B) Effet estimé de  $FecX^N$  en fonction de l'œstrus induit ou naturel en Blanche du Massif Central.

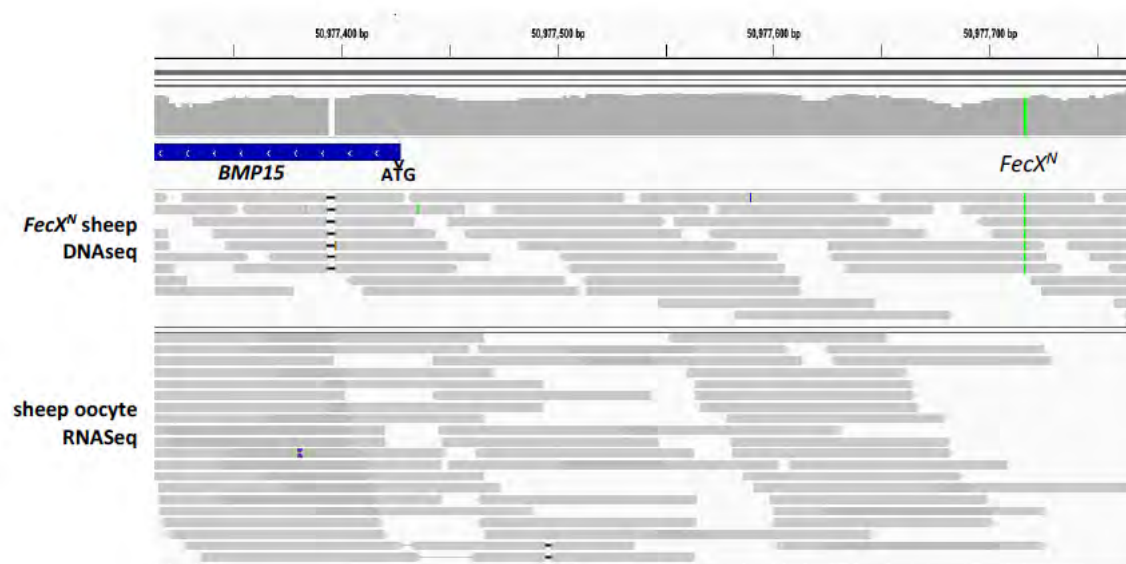


Figure 56: Localisation de  $FecX^N$  dans la région en amont de  $BMP15$ .

Capture d'écran de la visualisation sous Integrative Genomics Viewer (IGV v2.4.10) des alignements de la région en amont du gène  $BMP15$  ovin (coordonnées de l'assemblage OAR v3.1) avec des lectures du séquençage de l'ADN du génome complet (DNaseq) d'une brebis homozygote porteuse de  $FecX^N$  (ligne verte) et de l'ARNm total le séquençage d'ovocytes provenant de petits follicules antraux ovin (RNASeq, Bonnet et al. 2013), indiquant une localisation possible de  $FecX^N$  dans la région 5'UTR de  $BMP15$ .

### 3) Fréquence et effet de *FecX<sup>N</sup>* sur la prolificité

Afin d'estimer l'effet et la fréquence de la mutation *FecX<sup>N</sup>* dans la population Noire du Velay, j'ai génotypé par PCR-RFLP une nouvelle fois la cohorte de brebis utilisées pour la première étude (Article 1, Chantepie et al., 2018) et obtenu l'information pour 2323 brebis. Dans le même temps, en collaboration avec l'organisme de sélection de la race Blanche du Massif Central (ROM Sélection, section BMC), j'ai organisé la collecte d'une cohorte d'agnelles de renouvellement pour avoir accès à 2426 échantillons sanguins. Suite au génotypage, j'ai estimé la fréquence de l'allèle *FecX<sup>N</sup>* à environ 10% dans les deux populations, correspondant à un peu moins 20% de brebis porteuses hétérozygotes et 1% de brebis homozygotes fertiles (Tableau 19). La simple comparaison des moyennes de prolificité entre les génotypes montre un effet significatif de *FecX<sup>N</sup>* sur l'augmentation de prolificité dans les deux races ( $p < 0,01$ ), mais sans tenir compte de *FecL<sup>L</sup>* dans la population Noire du Velay.

De façon à estimer plus précisément l'effet de *FecX<sup>N</sup>* en corrigeant pour différents effets d'environnement et également pour la présence de *FecL<sup>L</sup>*, en collaboration avec Loys Bodin (INRA GEnPhySE), nous avons utilisé un modèle linéaire mixte (précisions données dans l'article 2 en suivant). L'analyse a pris en compte les performances enregistrées dans OVAL pour les femelles nées après 2000 avec leur pédigrée sur 5 générations (27754 brebis Noire du Velay avec 122110 enregistrements de mise-bas et 110848 brebis Blanche du Massif Central avec 461405 enregistrements de mise-bas) et les génotypes que j'ai générés au loci *FecL<sup>L</sup>* et *FecX<sup>N</sup>*.

Ainsi corrigé, l'effet de *FecX<sup>N</sup>* sur la taille de portée après œstrus naturel est estimé à +0,22 agneau par mise-bas en Noire du Velay à l'état hétérozygote. En comparaison, l'effet de *FecL<sup>L</sup>* à l'état hétérozygote est estimé à +0,41 agneau par mise-bas (Figure 57). Les mutations *FecL<sup>L</sup>* et *FecX<sup>N</sup>* ne semblent pas agir de façon strictement additive puisque les brebis doubles hétérozygotes ( $n=80$ ) montrent une baisse significative de la prolificité estimée à -0,05 agneau par mise bas par rapport à l'effet estimé cumulé des deux mutations (Figure 57 A). Dans la race Blanche du Massif Central, l'utilisation de traitements hormonaux (eCG/PMSG) pour la synchronisation est très répandue, même en monte naturelle. L'utilisation de la PMSG augmente la prolificité des brebis non porteuses de *FecX<sup>N</sup>* de +0,23 agneau par mise bas. Cependant, l'effet de l'allèle *FecX<sup>N</sup>* est toujours de +0,18 agneau par mise bas que ce soit sur œstrus naturel ou après traitement par la PMSG (Figure 57 B).

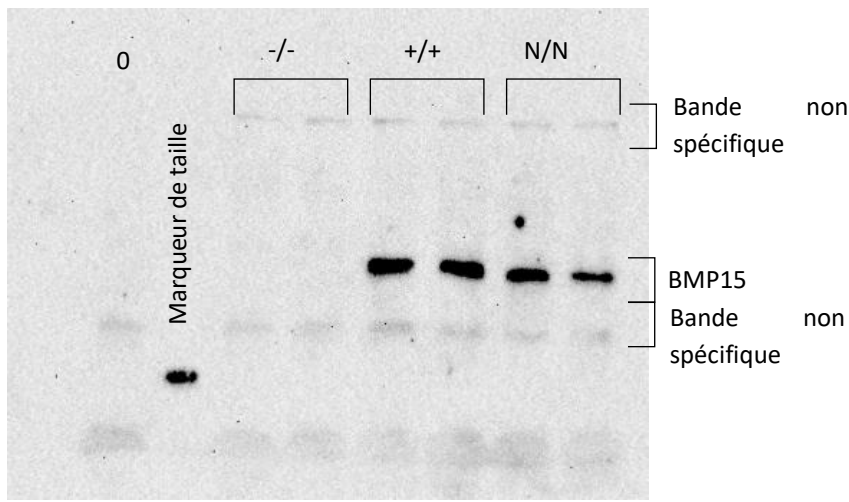


Figure 58: Résultat du Western Blot pour la protéine BMP15 mutante et sauvage produite *in vitro*.

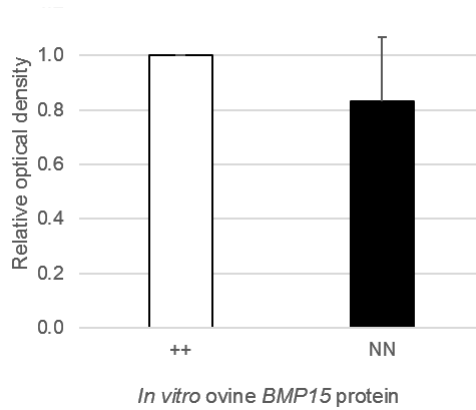


Figure 59: Quantification de la protéine BMP15 produite *in vitro*.

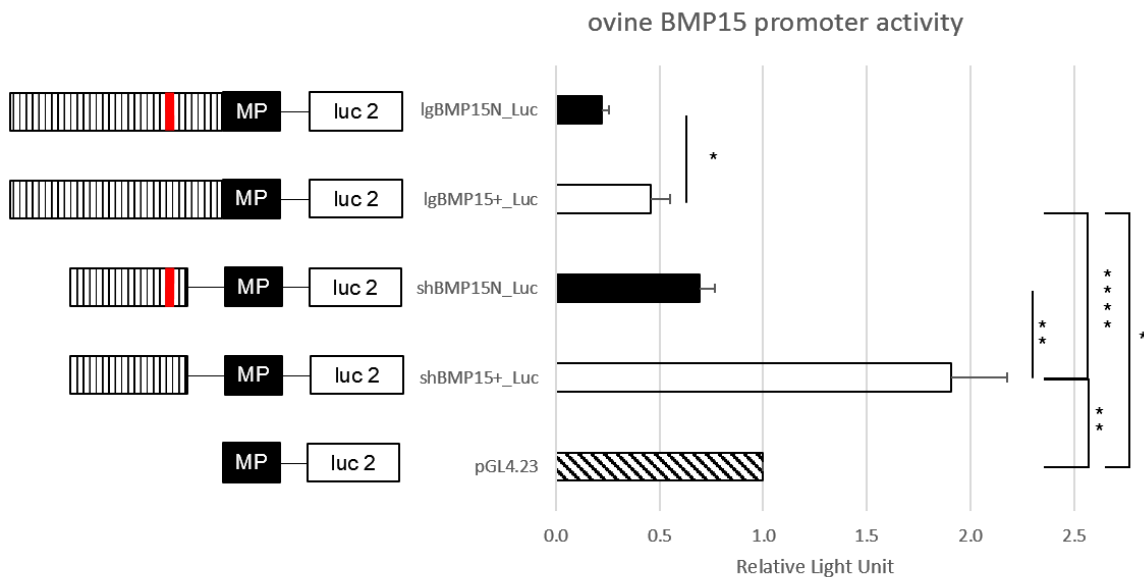


Figure 60: Effet fonctionnel de la mutation *FecX<sup>N</sup>* sur l'activité du promoteur BMP15

Dosage *in vitro* de la luciférase à partir de cellules CHO transfectées de manière transitoire avec un vecteur vide ou un promoteur BMP15 de type sauvage (BMP15<sup>+</sup>) ou un promoteur BMP15 mutant (BMP15<sup>N</sup>). Deux longueurs de fragment ont été générées sous forme longue (lg) de 732 pb (-743, -11 pb se rapportant au codon de départ ATG) ou sous forme courte (sh) de 341 pb (-443, -102 pb). Les résultats sont exprimés en tant que moyenne  $\pm$  SEM de l'unité de lumière relative (RLU) de 6 expériences de transfection indépendantes en triple. L'astérisque indique une différence significative \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ . MP: promoteur minimal de pGL4.23, Luc 2: gène rapporteur de la luciférase, barre hachurée: promoteur BMP15, barre rouge, SNP: OARX: 50977717T> A



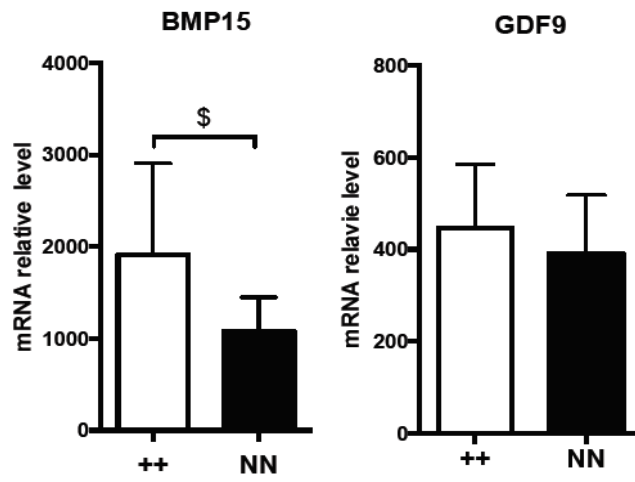
#### 4) Caractérisation fonctionnelle du rôle de *FecX<sup>N</sup>* sur le gène *BMP15*

D'après l'ensemble de ces données, il apparaissait clair que l'allèle *FecX<sup>N</sup>* est associé à une augmentation de la prolificité en races Noire du Velay et Blanche du Massif Central. La dernière partie de ce travail a consisté à définir, par des approches de biologie moléculaire, le rôle du polymorphisme g.5097717T>A sur le fonctionnement du gène *BMP15*. Comme indiqué précédemment, la mutation *FecX<sup>N</sup>* est localisée 290pb en amont du site d'initiation de la traduction de *BMP15* (le A du codon ATG étant pris comme référence +1 de la numérotation). N'ayant pas d'indication d'annotation d'une région non traduite 5'UTR, pour le gène *BMP15* ovin sur le génome de référence (OARv3.1), j'ai tiré parti des données publiques de séquences d'ARN d'ovocytes ovin (RNASeq Illumina, Bonnet et al., 2013). Après alignement de ces séquences sur le génome de référence ovin grâce à l'interface bioinformatique Galaxy (<https://galaxyproject.org> sur la plateforme bio-informatique de Toulouse Midi-Pyrénées <http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>) et l'outil d'alignement STAR2, j'ai pu visualiser que la mutation *FecX<sup>N</sup>* pouvait faire partie de la région 5'UTR de l'ARNm de *BMP15* (Figure 56).

En tenant compte de cette information, j'ai testé l'impact potentiel de *FecX<sup>N</sup>* sur l'efficacité de la transcription et de la traduction *in vitro* des ARNm de *BMP15* (PE 6). Après transfert et révélation de *BMP15* (Figure 58) et la quantification du signal indiquent que la transcription/traduction *in vitro* de *BMP15* ovin n'est pas altérée par la présence de la mutation *FecX<sup>N</sup>* dans la partie 5'UTR (Figure 59).

La seconde hypothèse que j'ai testée concerne une possible altération par *FecX<sup>N</sup>* de l'activité promotrice du gène *BMP15*. Pour cela, j'ai cloné deux fragments de la partie promotrice supposée du gène *BMP15* ovin (entre -743 et -11pb, et entre -443 et -102pb) en amont du gène rapporteur de la luciférase (PE 7). Après transfection transitoire dans des cellules ovariennes de hamster (CHO), j'ai pu montrer que la mutation *FecX<sup>N</sup>* diminue significativement l'activité promotrice de ces deux fragments ( $P < 0,05$ , ANOVA ; Figure 60).

Cette observation m'a conduit à penser que *FecX<sup>N</sup>* pourrait avoir un effet inhibiteur de l'expression de *BMP15* dans les ovocytes des brebis porteuses en lien avec leur hyperprolificité. Pour tenter de répondre à cette question, suite aux génotypages que j'ai réalisés dans les populations Noire du Velay et Blanche du Massif Central, nous avons fait l'acquisition de 5 brebis homozygotes *FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>N</sup>* et 5 brebis homozygotes *FecX<sup>+</sup>/FecX<sup>+</sup>* auprès d'éleveurs qui ont bien voulu nous les vendre. À partir des ovaires isolés à l'abattage dans la phase folliculaire du cycle



\$ :  $p < 0,17$

Figure 61: Effet de la mutation  $FecX^N$  sur l'expression de BMP15 et de GDF9 dans l'ovocyte ovin.

œstrien, j'ai collecté les ovocytes à partir des follicules en croissance de 1 à 3mm de diamètre (PE 9).

À partir de l'extraction d'ARN totaux issus de deux groupes de 5 ovocytes par brebis, j'ai réalisé des RT-qPCR pour quantifier l'accumulation des ARNm des gènes *BMP15* et *GDF9*. Si l'expression ovocytaire de *GDF9* ne semble pas affectée par la présence de *FecX<sup>N</sup>*, j'ai pu observer une diminution de 2 fois de l'accumulation *in vivo* des ARNm de *BMP15* dans les ovocytes des brebis *FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>N</sup>* (Figure 61). Cependant, l'analyse statistique ne montre qu'une tendance pour cet effet du génotype ( $p < 0,17$  ; ANOVA), certainement lié à un fort effet race dans l'échantillonnage (6 Noire du Velay et 4 Blanche du Massif Central).

En conclusion, la stratégie de recherche de mutation à effet majeur alliant les approches d'association génétique au niveau du génome complet, de séquençage complet de génome et de biologie fonctionnelle, a permis au cours de ce travail de mettre en évidence *FecX<sup>N</sup>* la première mutation régulatrice de l'expression de *BMP15* affectant la prolificité. L'ensemble de ce travail fait l'objet de l'article 2 ci-après, soumis pour publication dans Plos Genetics.

5) [Article II – Genome-wide identification of a regulatory mutation in \*BMP15\* controlling prolificacy in sheep, soumis](#)

# Genome-wide identification of a regulatory mutation in *BMP15* controlling prolificacy in sheep

L. Chantepie, L. Bodin, J. Sarry, F. Woloszyn, F. Plisson-Petit, J. Ruesche, L. Drouilhet and S. Fabre

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

## Abstract

The search for the genetic determinism of prolificacy variability in sheep has evidenced several major mutations in genes playing a crucial role in the control of ovulation rate. In the Noire du Velay (NV) sheep population, a recent genetic study has evidenced the segregation of such a mutation named *FecL<sup>L</sup>*. However, based on litter size (LS) records of *FecL<sup>L</sup>* non-carrier ewes, the segregation of a second prolificacy major mutation was suspected in this population. In order to identify this mutation, we have combined case/control genome-wide association study with ovine 50k SNP chip genotyping, whole genome sequencing and functional analyses. A new single nucleotide polymorphism (OARX:50977717T>A, NC\_019484) located on the X chromosome upstream of the *BMP15* gene was evidenced highly associated with the prolificacy variability ( $P = 1.93E^{-11}$ ). The variant allele was called *FecX<sup>N</sup>* and shown to segregate also in the Blanche du Massif Central (BMC) sheep population. In both NV and BMC, the *FecX<sup>N</sup>* allele frequency was estimated close to 0.10, and its effect on LS was estimated at +0.20 lamb per lambing at heterozygous state. Homozygous *FecX<sup>N</sup>* carrier ewes were fertile with increased prolificacy in contrast to numerous mutations affecting *BMP15*. At the molecular level, *FecX<sup>N</sup>* was shown to decrease *BMP15* promoter activity and to impact *BMP15* expression in oocyte. This regulatory action was proposed as the causal mechanism for the *FecX<sup>N</sup>* mutation to control ovulation rate and prolificacy in sheep.

## Author Summary

In the genetic etiology of women infertility syndromes, a focus was done on the oocyte-expressed *BMP15* and *GDF9* genes harboring several mutations associated with ovarian dysfunctions. In sheep also, mutations in these two genes are known to affect the ovarian function, increasing ovulation rate and litter size constituting the prolificacy trait genetically selected in this species. Through a genome-wide association study with the prolificacy phenotype conducted in the French Noire du Velay sheep breed, we identified on the X chromosome a novel mutation located in the regulatory region upstream of the *BMP15* gene. This mutation increased litter size by +0.2 lamb per lambing at the heterozygous state, possibly through an inhibition of *BMP15* expression within the oocyte. Our findings suggest a novel kind of *BMP15* variant responsible for high prolificacy, in contrast to all other *BMP15* variants described so far in the coding sequence.

## Introduction

There is now an accumulation of evidence that oocyte plays a central role in controlling the ovarian folliculogenesis, from the early stages up to ovulation. Among the local factors produced by the oocyte itself, members of the bone morphogenetic protein/growth and differentiation factor (BMP/GDF) family play an integral role in this control [1]. Among them, the most important are surely *BMP15* and *GDF9*. Knock-out mice models gave the first evidence of the importance of these two oocyte-derived factors acting individually as homodimers and/or through a synergistic co-operation to control the ovarian function [2,3].

In human also, a focus was done on *BMP15* and *GDF9* about their implication in various ovarian dysfunctions. Indeed, numerous heterozygous missense mutations have been identified in both genes associated with primary or secondary amenorrhea in different cohorts of women affected by primary ovarian insufficiency (POI) all over the world. Particularly, the 10-fold higher prevalence of *BMP15* variants among patients with POI compared with the control population supports the causative role of these mutations [1]. Alteration of *BMP15* and *GDF9* were also searched in association with the polycystic ovary syndrome (PCOS). Here again several missense variants were discovered in both genes, but the pathogenic role of these mutations remains controversial in the etiology of this syndrome. However, several studies have reported an aberrant expression of *BMP15* and *GDF9* in the ovary of PCOS [4,5]. Interestingly, some *BMP15* polymorphisms situated in the 5'UTR are significantly associated with the over response to recombinant FSH applied during assisted reproductive treatment and with the risk to develop an ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)[6,7]. Finally, polymorphisms in *BMP15* and *GDF9* genes were also searched in association with dizygotic twinning in human. If no convincing results were obtained for *BMP15*, some lost-of-function variants of *GDF9* were observed significantly more frequently in mothers of twins compared to the control population [8,9].

In parallel, the search for the genetic determinism of ovulation rate and prolificacy variability in sheep has also highlighted the crucial role of *BMP15* and *GDF9* by evidencing numerous independent loss-of-function mutations all altering the coding sequence of these two genes [1,10]. Depending on the mutation and its hetero- or homozygous state, the phenotype controlled by these mutations in *BMP15* and *GDF9* goes from the early blockade of the folliculogenesis, and subsequent sterility, to an extraordinary increase of the ovulation rate (OR) and thus litter size (LS) of carrier ewes [11–14]. Thus,

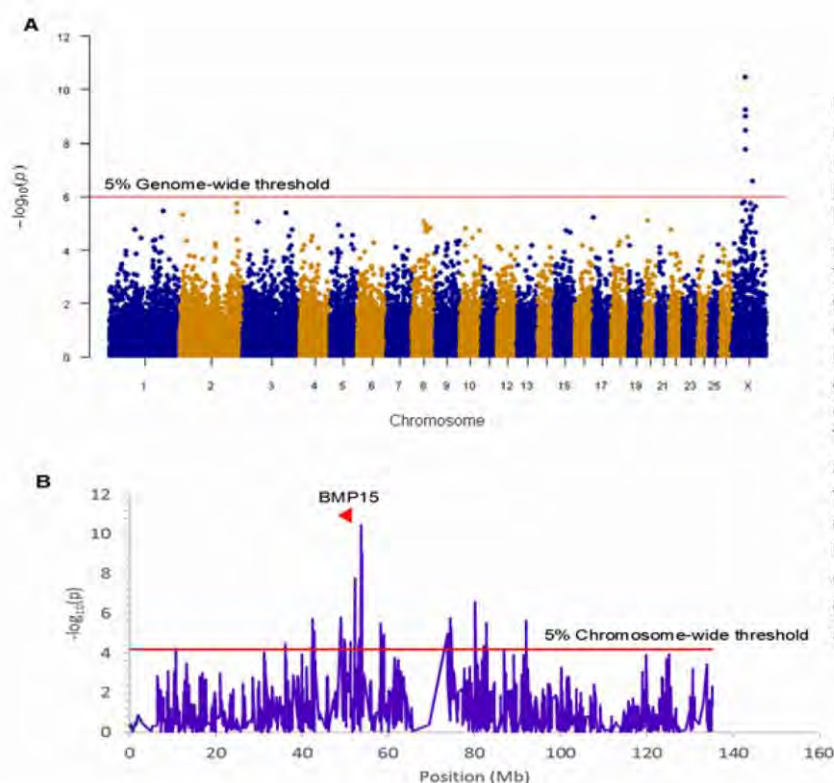
sheep exhibiting an extremely high prolificacy are of great interest for identifying genes and mutations involved in molecular pathways controlling the ovarian function. These animal models have a double interest, in agriculture for the genetic improvement of the prolificacy, and in human clinic for providing valuable candidate genes in the genetic determinism of female infertility or subfertility, as described above.

The Noire du Velay (NV) population is a French local sheep breed mainly reared in the Haute-Loire and Loire departments. Ewes present naturally out-of-season breeding ability, very good maternal characteristics and a quite high prolificacy (mean LS=1.62 lamb per lambing). Large variation in LS has been observed in this breed and a recent genetic study has evidenced the segregation of an autosomal mutation named *FecL<sup>L</sup>* controlling this trait [15]. This variant located in the intron 7 of the *B4GALNT2* gene and associated with its ectopic ovarian expression, was originally discovered in the Lacaune meat sheep breed, increasing OR and prolificacy [16]. For the segregation study, more than 2700 NV ewes with LS records were genotyped at the *FecL* locus [15]. Surprisingly, the distribution of LS and the existence of high prolific ewes among the *FecL<sup>L</sup>* non-carriers have suggested the possible segregation of a second prolificacy major mutation in this population as already observed in the Lacaune breed carrying both *FecL<sup>L</sup>* and *FecX<sup>L</sup>* [16,17]. In order to validate this hypothesis, after specific genotyping excluding all other known mutations affecting OR and LS and segregating in French sheep populations, we have performed a genome-wide association study (GWAS) based on a case/control design. Completed by the whole genome sequencing of two finely chosen animals, we have identified a new regulatory variant called *FecX<sup>N</sup>* affecting the oocyte-dependent expression of *BMP15* in association with increased prolificacy in Noire du Velay and one other French sheep breed.

## Results

### Genetic association analyses

A first set of genomic DNA from 30 NV ewes without the *FecL<sup>L</sup>* prolific allele at the *B4GALNT2* locus (LS records ranging from 2.00 to 3.00) was genotyped for already known mutations affecting sheep prolificacy at the 3 other loci, *BMPR1B*, *GDF9* and *BMP15*. Using specific RFLP assay (*BMPR1B*, [18]) or Sanger sequencing of coding parts (*GDF9* and *BMP15*, [19]), none of the known mutations were evidenced (data not shown). Thus, to establish the genetic determinism of the remaining LS variation in this population, 80 ewes were genotyped by Illumina Ovine SNP50 Genotyping Beadchip. The allele frequencies of the most highly prolific ewes (cases,



**Figure 1. Genome-wide and chromosome-wide association results.** (A) Genome-wide association results for litter size in the NV sheep population. Manhattan plot shows the combined association signals ( $-\log_{10}(\text{p-value})$ ) on the y-axis versus SNPs position in the sheep genome on the x-axis and ordered by chromosome number (assembly OARv3.1). Red line represents the 5% genome-wide threshold. (B) OARX chromosome-wide association results. The curve shows the combined association signals ( $-\log_{10}(\text{p-value})$ ) on the y-axis versus SNPs position on the X chromosome on the x-axis (assembly OARv3.1). Red line represents the 5% chromosome-wide threshold. The *BMP15* gene location is indicated by a red arrowhead.

**Table 1. Markers significantly associated with litter size**

SNP	Chromosome	Position <sup>a</sup>	MAF <sup>b</sup>	$P_{\text{Unadj}}^c$	$P_{\text{Chrom}}^d$	$P_{\text{Genome}}^e$
OARX_51294776.1	OARX	53756339	0.28	3.52E-11	4.18E-08	1.67E-06
s27837.1	OARX	53825247	0.30	5.83E-10	6.92E-07	2.77E-05
s73460.1	OARX	53905939	0.44	9.59E-10	1.14E-06	4.55E-05
s39212.1	OARX	53852735	0.44	3.46E-09	4.11E-06	1.64E-04
OARX_52608221.1	OARX	52367253	0.41	1.68E-08	2.00E-05	7.99E-04
s46003.1	OARX	80222479	0.44	2.56E-07	3.03E-04	1.21E-02
OARX_55032299.1	OARX	48942926	0.30	1.57E-06	1.86E-03	NS
OARX_72164491.1	OARX	74388397	0.23	1.71E-06	2.03E-03	NS
OARX_49135019.1	OARX	42475099	0.35	1.80E-06	2.13E-03	NS
OARX_111306030.1	OARX	92041520	0.27	2.25E-06	2.67E-03	NS
OARX_102620828.1	OARX	82796975	0.41	3.02E-06	3.59E-03	NS
s31917.1	OARX	58202482	0.44	3.12E-06	3.70E-03	NS
OARX_72351736.1	OARX	74590448	0.19	5.63E-06	6.68E-03	NS
OARX_72263548.1	OARX	74498463	0.17	6.45E-06	7.66E-03	NS
OARX_49564109.1	OARX	42876169	0.49	8.16E-06	9.69E-03	NS
DU400878_520.1	OARX	73847207	0.27	9.96E-06	1.18E-02	NS
s54281.1	OARX	58993959	0.24	1.20E-05	1.42E-02	NS
s05229.1	OARX	58346644	0.46	1.71E-05	2.03E-02	NS
s27938.1	OARX	53275559	0.35	1.77E-05	2.10E-02	NS
OARX_54104393.1	OARX	49870983	0.36	2.03E-05	2.41E-02	NS
OARX_72236232.1	OARX	74464263	0.18	2.23E-05	2.64E-02	NS
OARX_111349974.1	OARX	92085118	0.18	2.23E-05	2.65E-02	NS
OARX_53703822.1	OARX	51193144	0.35	2.59E-05	3.08E-02	NS
OARX_43227227.1	OARX	36235514	0.32	3.41E-05	4.04E-02	NS
OARX_51842287.1	OARX	53162079	0.49	3.43E-05	4.08E-02	NS
OARX_102654502.1	OARX	82837158	0.20	3.65E-05	4.33E-02	NS

3

<sup>a</sup>: Position of markers are based on the OARv3.1 assembly in bp.

<sup>b</sup>: MAF, minor allele frequency.

<sup>c</sup>:  $P_{\text{Unadj}}$  corresponds to exact unadjusted p-value for the Fisher's test.

<sup>d</sup>:  $P_{\text{Chrom}}$  corresponds to p-value after chromosome-wide Bonferroni correction.

<sup>e</sup>:  $P_{\text{Genome}}$  corresponds to p-value after genome-wide Bonferroni correction (NS, non-significant).

n=40, mean LS=2.47) and lowly prolific ewes (controls, n=40, mean LS=1.23) were compared to identify loci associated with LS using GWAS according to the procedures described in the Materials and Methods. Finally, genotype data were obtained from 79 animals (39 cases, 40 controls). Six markers located on OARX were significantly associated with LS variation at the genome-wide level after Bonferroni correction (Fig 1A, Table 1). Importantly, at the chromosome-wide level, a cluster of 26 significant markers encompassed the location of the *BMP15* candidate gene (Fig 1B). In order to better characterize this locus on the X chromosome, we have determined for each individual the most likely linkage phase across 80 markers (10Mb) including the significant region. After haplotype clusterization, a specific segment of 3.5 Mb (50639087–54114793 bp, OARv3.1 genome assembly) was identified to be more frequent in highly prolific cases than in controls ( $f_{\text{cases}}=0.51$  vs.  $f_{\text{controls}}=0.37$ ,  $P=1.92E^{-11}$ , Chi-square test) (Fig 2). This identified segment contained the *BMP15* gene (50970938-50977454 bp, OARv3.1) well-known to play a crucial role in the ovarian function and to be a target of numerous mutations in its coding region controlling prolificacy [1].

### Characterization of the mutation

While the *BMP15* gene could be considered as a positional and functional candidate gene, no mutation was evidenced by Sanger sequencing of the *BMP15* coding regions of the most prolific ewes studied. In order to find the potential causal mutation, we sequenced the whole genome of two finely chosen ewes based on the shortest haplotype within the region (homozygous reference vs. homozygous variant) and their opposite extreme phenotypes (LS 1.1 vs. 2.8).

Variant search analysis and annotations through GATK toolkit was limited to the OARX: 50639087-54114793 region. We detected 60 SNPs and 90 small insertions and deletions (INDELs) with quality score >30 (Table S1). Among them, we particularly focused on the 85 variants located within annotated genes (upstream, exon, intron, splice acceptor or donor, and downstream localization). After filtering these 85 variants for allele sharing with other breeds based on SheepGenome DB (<http://sheepgenomesdb.org/>) and 68 publicly available domestic sheep genomes (International Sheep Genomics Consortium; <http://www.sheepmap.org/>), none of them were removed, all being NV breed specific. Finally, and based on prolificacy gene knowledge, we were particularly interested in one SNP (T>A) identified in the upstream region of the *BMP15* gene at position 50977717 on OARX v3.1. We then developed a

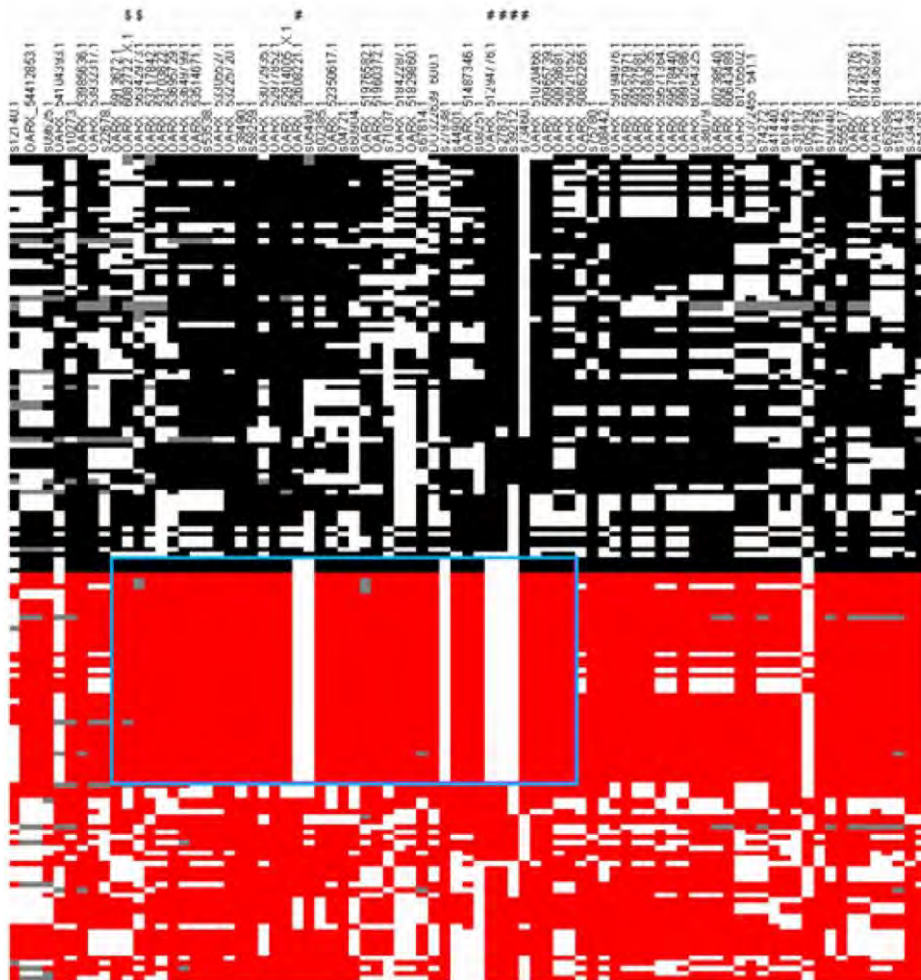
RFLP assay to specifically genotype for this polymorphism. Among the 79 animals of the GWAS, 31 ewes were heterozygous and 6 homozygous for the A variant allele. As shown in Table 2, most of the A carrier ewes were in the highly prolific Case group (34 among 39), while only 3 set in the Control group. When associating the LS performance of the 79 ewes to their genotype at the OARX: 50977717T>A SNP, the A non-carriers exhibited a mean LS of 1.36, heterozygous T/A a mean LS of 2.32 and homozygous A/A a mean LS of 2.73 indicating that the A allele of this polymorphism was strongly associated with increased LS in NV (T/A or A/A vs. T/T,  $P<1E^{-3}$ , one-way ANOVA). Furthermore, this polymorphism appears in total linkage disequilibrium with the six more significant markers from the GWAS analysis (Fig 3).

Genotype information at the OARX: 50977717T>A locus was introduced in the GWAS analysis. This SNP appeared as the most significant marker associated to the prolificacy phenotype ( $P_{\text{unadjusted}}=1.93E^{-11}$ ,  $P_{\text{Chromosome-wide corrected}}=1.62E^{-14}$  and  $P_{\text{Genome-wide corrected}}=9.13E^{-07}$ ) suggesting that it could be the causal mutation (Fig S1). In accordance with the *Fec* gene nomenclature, the mutant allele identified upstream of the *BMP15* gene in NV sheep was named *FecX<sup>N</sup>*.

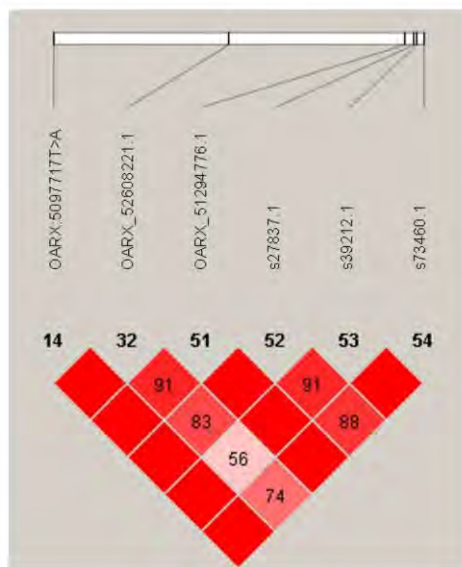
As described for other prolific alleles such as *FecB<sup>B</sup>*, *FecX<sup>G</sup>*, *FecX<sup>H</sup>*, *FecX<sup>Gr</sup>* and *FecL<sup>L</sup>*, a given mutation can segregate in several sheep populations [15,20–22]. We have tested the *FecX<sup>N</sup>* allele presence in a diversity of 26 sheep breeds representing 725 animals [23]. Among the breeds tested, the *FecX<sup>N</sup>* genotyping has confirmed the segregation of this mutation in NV breed and revealed its presence in the Blanche du Massif Central (BMC) and Lacaune breeds (Table 3). Additionally, the *FecX<sup>N</sup>* variant was absent from the Ensembl variant database (<http://www.ensembl.org>) compiling information from i) dbSNP, ii) whole genome sequencing information from the NextGen project (180 animals from various Iranian and Moroccan breeds) and iii) the International Sheep Genome Consortium (551 animals from 39 breeds all over the world).

**Table 2. Distribution of OARX: 50977717T>A SNP genotypes and associated LS in case and**

Group		TT	TA	AA
Low prolific control	n=	37	3	
	Raw mean LS	1.22	1.39	
Highly prolific case	n=	5	28	6
	Raw mean LS	2.41	2.43	2.73
<b>Total</b>		<b>42</b>	<b>31</b>	<b>6</b>



**Figure 2. Clusterization of haplotypes reconstructed at the OARX locus.** 80 markers encompassing the OARX region of interest (50.6 Mb-54.1 Mb) were selected to construct haplotypes from 39 cases and 40 control animals. Each column represents one SNP and each line represents one haplotype. For one marker (i) allele 1 is in black in controls, or in red in cases, (ii) allele 2 is in white when the phase was unambiguous and (iii) grey color represents unphased SNP. Haplotypes were ordered to distinguish controls versus cases and clustered to classify similar clades of haplotypes. The # sign flags SNP significantly associated with LS at genome-wide level. The \$ sign flags SNP flanking the *BMP15* genes (50970938-50977454 bp). The specific haplotype preferentially selected in highly prolific ewes (cases) is symbolized by the cyan rectangle.



**Figure 3. Linkage disequilibrium (LD) plot.** Generated by Haploview, pair-wise LD between SNP markers (OARX: 50977717T>A and the five genome-wide significant LS-associated markers) is represented by the  $D'$  value. Strong LD is represented in dark red boxes ( $D'=100$ ) and weaker LD ( $D'<100$ ) in lighter red boxes.



**Table 3. *FecX<sup>N</sup>* genotype distribution from a diversity panel of French ovine breeds**

Breed	Total	Genotype	
		+/+ (+/Y)	N/+ (N/Y) <sup>a</sup>
Berrichon du Cher	29	29	
Blanche du Massif Central	31	27	4
Causse du Lot	32	32	
Charmoise	31	31	
Charollais	29	29	
Corse	30	30	
Ile de France	28	28	
Lacaune (meat)	42	40	2
Lacaune (dairy)	40	40	
Limousine	30	30	
Manech tête rousse	29	29	
Martinik	22	22	
Mérinos d'Arles	26	26	
Mourerous	26	26	
Mouton Vendéen	30	30	
Noire du Velay	28	26	2
Préalpes du sud	27	27	
Rava	29	29	
Romane	29	29	
Romanov	26	26	
Rouge de l'Ouest	28	28	
Roussin	30	30	
Suffolk	20	20	
Tarasconnaise	32	32	
Texel	21	21	
<b>TOTAL</b>	<b>725</b>	<b>717</b>	<b>8</b>

<sup>a</sup>: +/+ or N/+ females, N/Y or N/+ hemizygous males.

### *FecX<sup>N</sup>* genotype frequency and effect on prolificacy

Large cohorts of ewes, chosen at random, were genotyped in order to accurately estimate the allele frequencies in the NV and the BMC populations (Table 4). The frequency of the N prolific allele at the *FecX* locus was similar in both populations, 0.11 and 0.10, with a distribution of 19.4% and 17.6% heterozygous, 1.5 % and 1% homozygous carriers in NV and BMC, respectively. The genotype frequencies were consistent with the Hardy Weinberg equilibrium (HWE) in both breed (NV  $P=0.28$  and BMC  $P=0.76$ ).

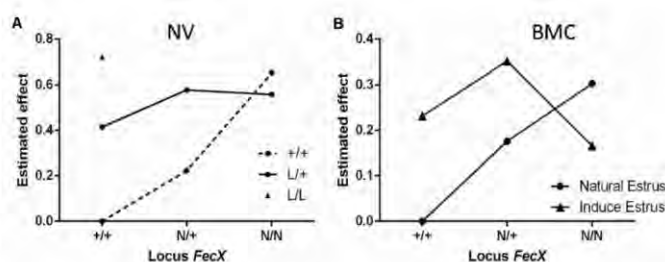
Based on the raw mean LS observations, the *FecX<sup>N</sup>* carrier ewes clearly exhibited increased LS compared to non-carriers in both populations (Table 4). The L prolific allele at the *FecL* locus is also segregating in NV [15]. Results of the linear mixed model showed that for the NV breed, one copy of the *FecX<sup>N</sup>* allele significantly increased LS by +0.22 and two copies increased LS by +0.65, while a single copy of the *FecL<sup>L</sup>* allele increased LS by +0.41 and

**Table 4. *FecX<sup>N</sup>* frequencies and effects on LS in NV and BMC breeds.**

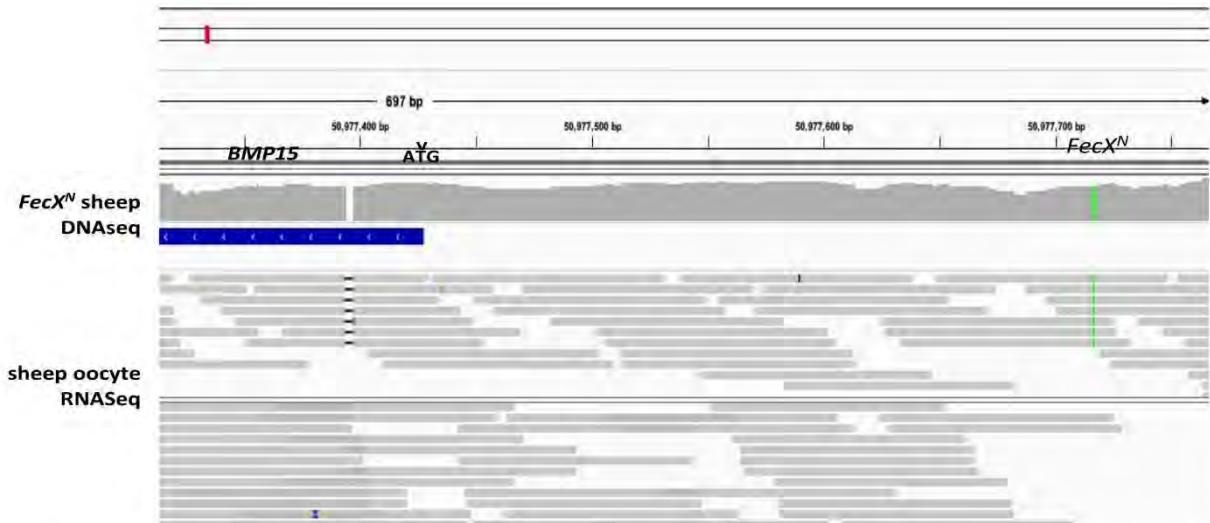
<i>FecX</i> genotype	Breed							
	NV (n=2323)			BMC (n=2456)				
	+/+	N/+	N/N	+/+	N/+	N/N		
Number of animals	1839	450	34	1999	432	25		
Frequency (%)	79.2	19.4	1.5	81.3	17.6	1		
Raw mean LS	1.66	1.93	2.45	1.56	1.79	1.87		
ANOVA solutions *								
	+/+	0.00	0.22	0.65	NE	0.00	0.18	0.30
<i>FecL</i> genotype	L/+	0.41	0.58	0.56	IE	0.23	0.35	0.17
	L/L	0.72	/	/				

<sup>a</sup> estimated increased LS compared to L and N non-carriers from the linear mixed models with interaction between genotypes at the *FecX* and *FecL* loci for the Noire du Velay (NV) breed and between *FecX* genotypes and estrus type (NE= natural estrus; IE = Induced estrus) for the Blanche du Massif Central (BMC) breed.

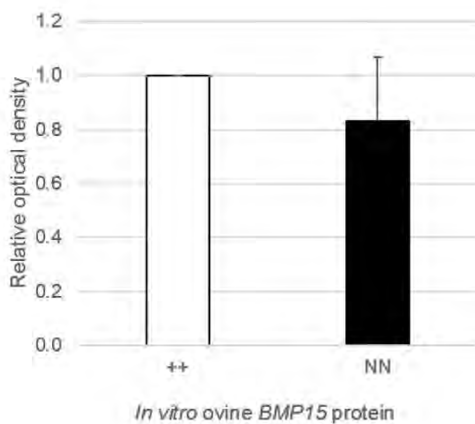
two copies by +0.72. Based on the 80 ewes genotyped heterozygous at both loci it appeared that the effect of *FecX<sup>N</sup>* and *FecL<sup>L</sup>* on LS was not fully additive, the expected LS being significantly slightly reduced by -0.05 (0.58 instead of 0.63) (Fig. 4 A). For the BMC population, compared to *FecX<sup>+</sup>/FecX<sup>+</sup>* ewes, *FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>+</sup>* exhibited increased LS by +0.18 and *FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>N</sup>* by +0.30 under natural estrus (Fig. 4 B). The use of PMSG for estrus synchronization increased LS significantly among *FecX<sup>+</sup>/FecX<sup>+</sup>* ewes (+0.23) and *FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>+</sup>* ewes (+0.18) while the effect on *FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>N</sup>* ewes was negative (-0.13). The combined effect of the first copy of the *FecX<sup>N</sup>* allele and the use of PMSG treatment was not fully additive, the interaction being significant although low (0.35 instead of 0.41) (Fig. 4 B).



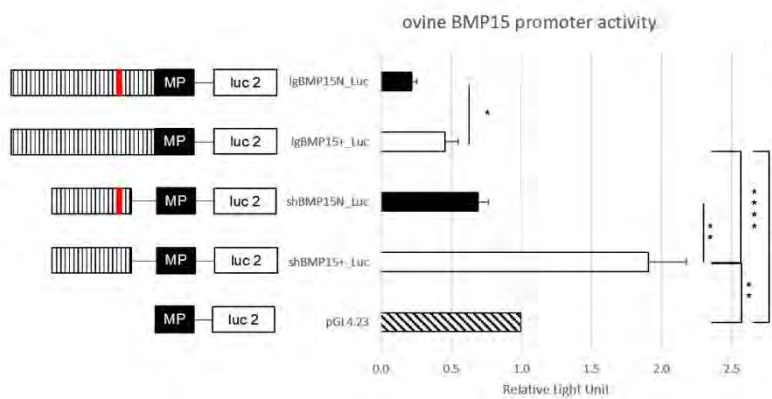
**Figure 4. Estimated effect of *FecX<sup>N</sup>*.** A) Estimated effect of *FecX<sup>N</sup>* knowing *FecL<sup>L</sup>* genotype in Noire du Velay (NV). B) Estimated effect of *FecX<sup>N</sup>* according to induced or natural estrus in Blanche du Massif Central (BMC). Estimated increased LS from the linear mixed models with interaction between genotypes at the *FecX* and *FecL* loci for NV, and between *FecX* genotypes and estrus type for BMC are given relative to L and N alleles non-carrier ewes (+/+).



**Figure 5. Localization of *FecX<sup>N</sup>* in the *BMP15* upstream region.** Integrative Genomics Viewer (IGV v2.4.10) snapshot of the ovine *BMP15* gene upstream region alignments (coordinates from OAR v3.1 assembly) with reads from whole genome DNA sequencing (DNaseSeq) of a homozygous *FecX<sup>N</sup>* carrier ewe (green line) and total mRNA sequencing of ovine oocytes from small antral follicles (RNASeq, Bonnet et al. 2013), indicating a possible localization of *FecX<sup>N</sup>* in the 5'UTR region of *BMP15* (ATG start codon is indicated by an arrowhead and *BMP15* gene annotation is on the minus strand).



**Figure 6. Effect of *FecX<sup>N</sup>* mutation on the *BMP15* protein produced *in vitro*.** *In vitro* transcription and translation were realized in duplicate in 6 independent TnT experiments. Chemiluminescent signal was captured by a ChemiDoc MP imaging system and images were quantified and analyzed with the Image Lab Software (Bio-Rad).



**Figure 7. Functional effect of *FecX<sup>N</sup>* mutation on the *BMP15* promoter activity.** *In vitro* reporter luciferase assay from CHO cells transiently transfected with empty vector or wild-type *BMP15* promoter (*BMP15<sup>+</sup>*) or mutant *BMP15* promoter (*BMP15<sup>N</sup>*). Two fragments were generated, a long (lg) form of 732 bp (-743, -11bp referring to ATG start codon) and a short (sh) form of 341bp (-443, -102bp). Results are expressed as means  $\pm$  SEM of the relative light unit (RLU) from 6 independent transfection experiments in triplicate. Asterisk indicates significant difference \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ . MP: minimal promoter of pGL4.23, Luc 2: luciferase reporter gene, hatched bar: *BMP15* promoter, red line: *FecX<sup>N</sup>* mutation

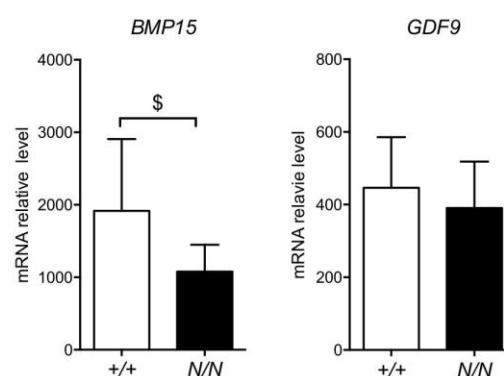
## Functional effects of the *FecX<sup>N</sup>* mutation

As described above, *FecX<sup>N</sup>* is located upstream of the coding region of the *BMP15* gene when referencing to the ovine genome v3.1 (ensembl.org) or v4.0 (ncbi.nlm.nih.gov). In both versions of the ovine genome, the *BMP15* gene annotation begins at the ATG start site and *FecX<sup>N</sup>* is located -290pb upstream, possibly in the 5'UTR and/or the proximal promoter region. As a first approach, we took advantage of RNA sequencing data from ovine oocytes publicly available at EMBL-EBI [24]. After reads mapping against the ovine genome (v3.1) using STAR2 aligner within the Galaxy pipeline and visualization with Integrative Genome Viewer (IGV), the Fig 5 shows the location of *FecX<sup>N</sup>* within the possible 5'UTR of the *BMP15* gene when expressed in the oocyte. Consequently, we have first tested the potential functional impact of *FecX<sup>N</sup>* on the *in vitro* stability and translatability of the *BMP15* mRNA. Thus, the reference (T, *FecX<sup>+</sup>*) and variant (A, *FecX<sup>N</sup>*) forms of the ovine *BMP15* cDNA (-297, +1183 referring to ATG start codon) were cloned in a pGEM-T vector for subsequent *in vitro* T7 promoter-dependent transcription/translation experiment using reticulocyte lysate solution. As shown in Fig 6, the western blotting of the *BMP15* proteins produced from both forms and their chemiluminescent quantification revealed that the *FecX<sup>N</sup>* mutation had no significant impact on the overall stability and translatability of the *BMP15* mRNA in this condition.

As a second hypothesis, we have tested the *FecX<sup>N</sup>* impact on the *BMP15* promoter activity. Two promoter regions were tested ([-743,-11] bp and [-443,-102] bp referring to ATG start codon) cloned in front of the luciferase reporter gene and transiently expressed in CHO cells cultured *in vitro*. As shown by the luciferase assays (Fig 7), the *FecX<sup>N</sup>* variant was able to significantly reduce the luciferase activity in the context of both the long or the short *BMP15* promoters, indicating the possible inhibitory impact of *FecX<sup>N</sup>* on *BMP15* gene expression. To go further with this hypothesis, *in vivo* *BMP15* gene expression was measured directly on isolated oocytes pools from NV and BMC homozygous ewe carriers and non-carriers of the *FecX<sup>N</sup>* allele. Real-time qPCR experiments revealed a tendency of the *BMP15* expression to be decreased by 2-fold ( $P=0.17$ , genotype effect, two-way ANOVA) in the oocytes of *FecX<sup>N</sup>* carriers despite a large inter-animal variability. In contrast, the expression of the second oocyte-specific prolificacy major gene *GDF9* seemed unaffected (Fig 8).

## Discussion

The present study identified the g.50977717T>A variant on the ovine chromosome X upstream of the *BMP15* gene as the most likely causative mutation



**Figure 8. Effect of *FecX<sup>N</sup>* mutation on *BMP15* and *GDF9* expression in ovine oocyte.** Quantitative real-time PCR results of *BMP15* (A) and *GDF9* (B) expression in oocyte pools from growing (1-3mm) follicles (n=20 pools of 5 oocytes) from homozygous *FecX<sup>N</sup>* carrier (N/N, n=5) and non-carrier ewes (+/+, n=5) during the follicular phase of the estrus cycle. Results are expressed as means  $\pm$  SEM of the mRNA relative level for each genotype, using GAPDH and SDHA as internal references. Raw data were analyzed by two-way ANOVA. Dollar symbol indicates a suggestive difference between genotypes, \$:  $p=0.166$ .

for the increased prolificacy of the NV ewes. The highly significant genetic association with the extreme LS phenotype, the significant effect of the A variant on increasing prolificacy by +0.2 lamb per lambing in a large set of NV ewes, also found in the BMC genetic background, and the demonstrated action on *BMP15* transcriptional activity all support the causality of this mutation named *FecX<sup>N</sup>*.

The *BMP15* gene is at the top of the list of candidate genes controlling the ovarian function, ovulation rate and thus prolificacy in the ovine species, with nine independent causal mutations identified out of the sixteen already known. Indeed, 7 SNPs and 2 small INDELS all within the open reading frame were evidenced affecting the *BMP15* function. Among these mutations, 2 SNPs and the 2 INDELS impaired the protein production either by generating premature stop codon (*FecX<sup>H</sup>*; *FecX<sup>G</sup>*, [11,12]) or by breaking the reading frame (*FecX<sup>R</sup>*; *FecX<sup>Bar</sup>*, [25,26]). The 5 other SNPs generate non-conservative amino acid substitutions all leading to a loss of function of *BMP15* ranging from inhibited protein production (*FecX<sup>L</sup>*, [17]), impaired interaction with *GDF9* (*FecX<sup>I</sup>* and *FecX<sup>B</sup>*, [27]), to altered cell signalling activity (*FecX<sup>Gr</sup>* and *FecX<sup>O</sup>*, [14]). In contrast with the 9 mutations described above, the *FecX<sup>N</sup>* variant evidenced in the present study is not located in the open reading frame of *BMP15* and does not alter the protein sequence. However, no other polymorphism genetically linked to *FecX<sup>N</sup>* was found in the *BMP15* coding sequence when checked by whole genome or local Sanger sequencing of the *BMP15* gene from *FecX<sup>N</sup>* carrier animals. Of course, this does not rule out the possibility of a polymorphism lying in another gene nearby with a still unknown role in the ovarian function and

prolificacy. Nevertheless, we did not find any polymorphism (SNP and INDEL) altering the coding sequence of genes annotated in the significantly LS-associated genetic region of 3.5Mb on OARX (Table S1), leaving *BMP15* as the most obvious candidate.

Whatever the version of the ovine reference genome (Oar\_v3.1, Oar\_v4.0 or even the last Oar\_rambouillet\_v1.0) the annotation of the *BMP15* gene always starts at the ATG initiating codon. Using publicly available transcriptome data from ovine oocytes RNAseq analysis, we were able to show that *FecX<sup>N</sup>* located 290bp upstream of *BMP15* could stand in its 5'UTR region. From our *in vitro* functional analyses, *FecX<sup>N</sup>* was not demonstrated to influence the translatability of the *BMP15* mRNA, but in the contrary it was shown to decrease the *BMP15* promoter activity. Little is known about transcription factors able to regulate *BMP15* expression. Several regulatory elements were evidenced in the pig *BMP15* promoter hosting consensus binding sites for LHX8, NOBOX and PITX1 transcription factors. However, only LHX8 was demonstrated as functionally activating the porcine *BMP15* promoter activity [28]. In human, a regulatory mutation in the 5'UTR of *BMP15* (c.-9C>G) was associated to non-syndromic premature ovarian failure [29], but also to iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome [6]. This mutation was shown to enhance the fixation of the PITX1 factor transactivating the *BMP15* promoter [30]. However, the *FecX<sup>N</sup>* position does not fit with the syntenic location of porcine LHX8 and human PITX1 binding sites on the ovine *BMP15* promoter. Using the MatInspector promoter analysis tool (Genomatix), we were only able to hypothesize an alteration by *FecX<sup>N</sup>* of a putative TATA-box like sequence (TTAAATA >TTATATA). Unfortunately, our electromobility shift assay attempts using CHO nuclear extracts failed to demonstrate the binding of any factor at the *FecX<sup>N</sup>* position (data not shown), preventing us from defining the precise molecular mechanism by which *FecX<sup>N</sup>* decreases the *BMP15* promoter activity.

The inhibition of the promoter activity combined with the apparent decreased of *BMP15* mRNA accumulation in homozygous *FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>N</sup>* oocytes seem to confirm the transcriptional regulatory role of *FecX<sup>N</sup>*. However, the moment we have chosen during the follicular phase of the late folliculogenesis for the comparative analysis between *FecX<sup>\*</sup>* and *FecX<sup>N</sup>* oocytes from antral follicles could not be optimal to visualize a highly significant differential expression of *BMP15*. The *BMP15* gene expression in ovine oocytes begins during the primary stage of follicular development and its expression increases up to the antral stages [31,32]. Moreover, the streak ovaries phenotype of infertile ewes carrying

homozygous mutations in *BMP15* have evidenced its crucial role in controlling the primary to secondary follicle transition [11,17,26]. Consequently, it would certainly be appropriate to follow the *BMP15* expression in *FecX<sup>N</sup>* carrier ewes from these early stages of folliculogenesis to better decipher the mutation impact on ovarian physiology. Nevertheless, the fact that *FecX<sup>N</sup>* inhibits the *BMP15* gene expression fits well with the physiological and molecular models associating BMP system loss-of-function and increased sheep prolificacy [14,33].

One copy of *FecX<sup>N</sup>* allele significantly increased by +0.30 to +0.50 the raw mean LS of NV ewes. When corrected for different environmental effects and more particularly for the genotype at the *FecL* locus, the estimated effect of *FecX<sup>N</sup>* on LS was +0.22 lamb per lambing for the first copy and +0.43 for the second copy. This effect was in the range of already known prolific alleles in various sheep breeds (Jansson, 2014 [34]). The effect of *FecX<sup>N</sup>* on LS seems independent of the genetic background. Indeed, the estimated positive effect of *FecX<sup>N</sup>* on prolificacy was confirmed in BMC breed with +0.18 lamb per lambing based on natural estrus. Moreover, the same robust effect was observed even in the presence of PMSG for synchronizing the estrus cycles preceding the lambing. The same observation is made for other mutations controlling sheep prolificacy. For instance, the *FecL<sup>L</sup>* allele exhibited a similar effect on LS in NV (+0.41, present study; +0.42 [15]), Lacaune (+0.47 [35]) and D'man (+0.30 [22]), and this was also observed for the *FecB<sup>B</sup>* allele introgressed in several populations [36].

By genotyping a diversity panel, we also evidenced the presence of 2 *FecX<sup>N</sup>* carrier animals in the Lacaune meat strain which will require further genotyping of numerous animals. If this is confirmed, the Lacaune meat breed will be another population, as Belclare, where 3 different natural prolific mutations are [12,16,17]. The presence of *FecL<sup>L</sup>* in both NV and Lacaune, and the presence of *FecX<sup>N</sup>* in NV, BMC and Lacaune, also raises the question of the origin of these mutations. From population structure analysis, it was shown that NV, BMC and Lacaune shared the same origin within the European southern sheep populations that may explain the segregation of the same mutations in these populations [23].

In conclusion, through a case/control GWAS strategy and genome sequencing, we have identified in the NV breed a second prolific mutation named *FecX<sup>N</sup>* affecting the expression of the *BMP15* gene, a well-known candidate gene controlling OR and LS in sheep. This work confirms the relevance of the whole genome approaches to decipher the genetic determinism of the prolificacy trait. Homozygous

*FecX<sup>N</sup>/FecX<sup>N</sup>* animals were still hyperprolific as already observed for *FecX<sup>Gr</sup>* and *FecX<sup>O</sup>*, but in contrast with sterile animals observed for the 7 other *FecX* homozygous variants in *BMP15*. As an upstream regulatory mutation, *FecX<sup>N</sup>* also contrasts with these 9 other prolific causal mutations all evidenced in the coding part of *BMP15* and altering the protein function. Thanks to this new sheep model, the genetic etiology of ovarian pathologies in women could be improved by searching polymorphisms, not only in the coding region, but also in the regulatory parts driving the *BMP15* expression within the oocyte.

## Materials and Methods

### Animals

Ewes from the NV breed (n=2266) were genotyped on blood DNA at the *FecL* locus as already described [15]. In order to test the hypothesis of the segregation of a second major mutation controlling LS in this breed, a first set of 80 ewes with at least 5 LS records (mean LS=1.84; ranging from 1.00 to 3.50) were selected among the *FecL<sup>+</sup>* homozygous genotype (n=2151, mean LS=1.58). Subsequently, for NV breed, the effect of the *FecX<sup>N</sup>* mutation on LS was estimated on 2252 ewes, considering the genotype at the *FecL* locus. The presence of the *FecX<sup>N</sup>* mutation in other breeds was checked on a diversity panel of 725 animals from 26 French sheep breeds ([23]; Table 3). For the BMC population, the effect of the *FecX<sup>N</sup>* mutation on LS was estimated on 2456 ewes. For gene expression analysis, 10 homozygous ewes at the *FecX<sup>N</sup>* locus (5 carriers and 5 non-carriers of the *N* allele) were bought from private breeders (6 NV and 4 BMC) and reared at INRA experimental facility (agreement number: D3142901). All experimental procedures were approved (approval number 01171.02) by the French Ministry of Teaching and Scientific Research and local ethical committee C2EA-115 (Science and Animal Health) in accordance with the European Union Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

### Biological samples

All blood sampling from the numerous sheep breeds studied were collected from jugular vein (5 ml per animal) by Venoject system with EDTA and directly stored at -20°C for further use. Part of these blood samples (GWAS and diversity panel) was used for extraction of genomic DNA as described [17]. All other samples were used for direct genotyping on whole blood without DNA purification [15].

For ovary collection and oocyte isolation, the estrus cycles of all adult NV and BMC ewes were

synchronized with intravaginal sponges impregnated with flugestone acetate (FGA, 30 mg, CEVA) for 14 days. Ovaries were collected at slaughtering during the follicular phase 36h after FGA sponge removal. Cumulus-oocyte complexes (COC) were immediately recovered from all visible 1-3mm follicles by aspiration using a 1ml syringe with a 26G needle and placed in McCoy's 5A culture medium (Sigma-Aldrich). COC were mechanically dissociated by several pipetting and washing cycles in 150µl drops of McCoy's 5A medium and finally, denuded oocytes devoid of granulosa cells were recovered in 1X PBS. Only intact oocytes with a good homogeneity of the cytoplasm were grouped to obtain two to three pools of 5 oocytes per animal and stored at -80°C before RNA extraction.

### Genotyping analyses

The *FecL<sup>L</sup>* mutation (OAR11:36938224T>A, NC\_019468) was genotyped directly on whole blood samples by the KAPA-KASP assay as already described [15]. As a prerequisite before GWAS, a set of 30 high prolific *FecL<sup>+</sup>/FecL<sup>+</sup>* ewes were controlled for the absence of other evidenced major mutations affecting sheep prolificacy in French populations. Using the same KAPA-KASP assay, *FecX<sup>L</sup>* and *FecX<sup>Gr</sup>* alleles in *BMP15* were genotyped as described [15]. *FecB<sup>B</sup>* in the exon 7 of the *BMPR1B* gene (OAR6:29382188A>G, NC\_019463.1) was genotyped using forced restriction fragment length polymorphism (RFLP) as described by Wilson et al. (2001)[18].

The whole genome genotyping was performed on 80 ovine genomic DNA using the OvineSNP50 Genotyping Beadchip from Illumina according to the manufacturer's protocol at the Laboratoire d'Analyses Génétiques pour les Espèces Animales, (LABOGENA, Jouy en Josas, France; www.labogena.fr). From the dataset, individuals with a call rate <0.98 were excluded. SNP exclusion thresholds were: call frequency <0.95, and minor allele frequency (MAF) <0.01; or a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the controls ( $p < 1.10^{-6}$ ). Non-polymorphic SNP positions and markers with no position on the OARv3.1 reference genome map were also discarded. Finally, from the available design of 54241 SNPs available on the Illumina OvineSNP50 Beadchip and 80 selected NV ewes, the final dataset was reduced to 47446 SNPs analyzed in 79 individuals.

The *FecX<sup>N</sup>* mutation (OARX: 50977717T>A, NC\_019484) was genotyped by a RFLP analysis using the Mse1 restriction enzyme (New England Biolabs) after a first step of Terra PCR Direct Polymerase Mix amplification (Takara) using one µl

sample of total blood. The accuracy of the *FecX<sup>N</sup>* RFLP genotyping was controlled by Sanger sequencing on few samples using the same amplification primers.

PCR amplifications were conducted independently for each locus studied on an ABI2400 thermocycler (Applied Biosystems) with the following conditions: 5min at 94°C, 32 cycles of 30s at the specific melting temperature, 30s at 72 °C and 30s at 94 °C, followed by 5 min at 72 °C. The primers used in this study are listed in Table S2.

### Whole genome sequencing (WGS) analysis

DNA sequencing libraries were constructed from 1 µg of genomic DNA using TruSeq DNA PCR-free Library Prep kit (Illumina). Sequencing was run on an Illumina HiSeq 2500 apparatus using a paired-end read length of 2x150 pb with the Illumina Reagent Kits as already described [37]. WGS was performed at the Genotoul-GeT core facility (INRA Toulouse, <https://get.genotoul.fr>). The raw reads of Illumina DNA sequencing were preprocessed by removing adapter sequences. After quality control, the FastQ files and metadata were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) at NCBI (SUB2795301). Reads mapping and variants calling were performed using the local instance of Galaxy (<https://galaxyproject.org>) at the Toulouse Midi-Pyrénées bioinformatics platform (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>). The cleaned paired reads were combined and mapped against the ovine genome assembly (Oar\_v3.1.86) using BWA-MEM (Galaxy version 0.7.17.1). The resulting BAM files were sorted using Samtools\_sort (Galaxy version 1.0.0). Sorted and indexed BAM files were visualized through Integrative Genome Viewer, IGV software version 2.4.10 [38]. A GFF3 annotation file was obtained from Ensembl (Ovis\_aries.Oar\_V3.1.78). We applied GATK version 3.5-0 to performed SNP and InDel discovery and genotyping across the two samples simultaneously using standard filtering parameters according to GATK Best Practices recommendations [39,40]. Variants effect and annotation were realized by SNPEff version 4.1 and filtering of interesting variants was performed using the SNPSift tool.

### In vitro transcription and translation of BMP15

The full-length cDNA of ovine BMP15 (1480bp [-297,+1183] referring to ATG start codon) with or without the *FecX<sup>N</sup>* mutation was generated from oocyte-derived RNA after a reverse transcription (RT) step (described in RNA extraction and RT paragraph, primers are listed in Table S2). The resulting PCR products were inserted by TA cloning into pGEM-T Easy plasmid (Promega) possessing

T7 and SP6 promoters. The orientation of insertion and exclusion of unexpected PCR-induced mutations were controlled by Sanger sequencing.

*In vitro* transcription and translation were realized from 500ng of cDNA pGEM-T construct using the TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation kit (Promega) and Transcend Biotin-Lysine-tRNA following the manufacturer protocol. Reactions for each construct were run in duplicate in 6 independent TnT experiments. The resulting BMP15 protein was revealed using Transcend non-radioactive translation detection system with chemiluminescent method (Promega) after reducing SDS-PAGE on a gradient (4-15%) polyacrylamide gel (Promega) and transfer onto nitrocellulose membrane. Chemiluminescent signal was capture by a ChemiDoc MP imaging system and images were analyzed with the Image Lab Software (Bio-Rad).

### BMP15 promoter activity

The promoter sequence of the ovine *BMP15* gene was amplified by PCR on genomic DNA from both homozygous *FecX<sup>+</sup>* and homozygous *FecX<sup>N</sup>* ewes. Two sizes of fragments were generated for cloning the *BMP15* promoter in front of the luciferase (Luc) reporter gene, a long (lg) form of 732 bp ([-743,-11] bp referring to ATG start codon) and a short (sh) form of 341bp ([-443,-102] bp). The PCR products were engineered for digestion using Kpn1 and Hind3 restriction enzymes (New England Biolabs) and inserted into the pGL4.23 vector (Promega). The four resulting constructs (lgBMP15<sup>+</sup>-Luc; lgBMP15<sup>N</sup>-Luc; shBMP15<sup>+</sup>-Luc; shBMP15<sup>N</sup>-Luc) were controlled by Sanger sequencing. Primers used to generate these constructs are listed in Table S2. Twenty-four hours after seeding (3.10<sup>4</sup> cells/well, 24 wells plate), CHO (Chinese Hamster Ovary) cells were transfected using Lipofectamine 3000 (Invitrogen) with 500ng/well of pGL4.23 constructs either empty or containing *BMP15* promoter fragment. Forty-eight hours after transfection, cells were lysed and assayed for luciferase activity (Luciferase reporter assay kit, Promega). Luminescence in relative light units (RLU) was measured by a Glomax microplate reader (Promega). Each construct was assayed in triplicate in 6 independent transfection experiments.

### RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA from pools of 5 oocytes were extracted using the Nucleospin RNA XS kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel) and including a DNase1 treatment. The low quantity of RNA recovered did not allow quantification. So, the equivalent of 1.25 oocyte was reverse-transcribed

using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) and anchored oligo(dT)22 primer (1  $\mu$ l at 10  $\mu$ M). Primer design using Beacon designer 8.20 (Premier Biosoft), SYBR green real-time PCR cycling conditions using QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system (ThermoFisher Scientific) and amplification efficiency calculation ( $E=e^{(-1/\text{slope})}$ ) were as already described in Talebi et al. (2018)[19]. Primer sequences, amplicon length and amplification efficiency are listed in Table S2. RNA transcript abundance was quantified using the  $\Delta$ Ct method with the mean expression of GAPDH, and SDHA as internal reference and following the formula  $R=[E_{\text{ref}}^{\text{Ct}_{\text{ref}}}/E_{\text{target}}^{\text{Ct}_{\text{target}}}]$ . The two reference genes were validated by the Bestkeeper algorithm [41].

### Data analysis

Single-marker association analyses were conducted using a Fisher's exact test and a Bonferroni correction has been applied to check for significance levels. The chromosome-wide and genome-wide values have been established as mentioned by Balding et al. 2006 [42]. Statistical analyses were done using PLINK1.9 software under a case/control design [43]. Among the 79 datasets of 47446 SNPs analyzed, the LS trait was considered as case when mean LS  $\geq 2.18$  (n=39) and control when LS  $\leq 1.45$  (n=40). Haplotypic association analysis on X chromosome were performed using FastPhase software [44]. Empirical significance levels were calculated using maximum statistic permutation approach (max (T), n=1000).

Allele effect on LS was estimated in NV and BMC breeds on data extracted from the French national database for genetic evaluation and research managed by the Institut de l'Élevage (French Livestock Production Institute) and the CTIG (Centre de Traitement de l'Information Génétique, Jouy-en-Josas, France). Only females born after 2000 were retained (27 754 NV ewes with 122 110 LS records and 110 848 BMC ewes with 461 405 LS records) with their pedigree over 5 generations. *FecX<sup>NV</sup>* genotype effect on the subset of 79 case/control animals was assessed by one-way ANOVA, follow by Newman-Keuls post-hoc test. For the large animal cohort analyses, the linear mixed models used were as similar as possible to those of the national genetic evaluation system [45]. In the present study, the following fixed effects were considered: i) the genotype at the *FecX* locus, ii) the month of birth (12 levels) iii) a physiological status effect combining parity, age at first lambing, rearing mode and postpartum interval (44 levels) and iv) a combination of the flock year and season effect. Two random effects were added to the model: a permanent environmental effect and an animal additive genetic effect. Moreover, an additional fixed effect of the

reproduction type was considered for the BMC breed for which some hormonal treatments are used each year (87% and 13% after natural and induced estrus in the data set). For the NV breed, since the *FecL<sup>L</sup>* allele is also segregating in the population [15], the effect of the genotype at this locus (2252 known and 25502 unknown genotypes) as well as its interaction with the genotypes at the *FecX* locus were considered. All these models were fitted using the ASReml software [46].

For reporter luciferase assays, differences between constructs were analyzed by one-way ANOVA follow by Newman-Keuls post-hoc test. The comparison between *FecX* genotypes data (blot quantification, qPCR) were analyzed using Student's t-test, using Welch's correction when variances were heterogeneous.  $P > 0.05$  was considered as not significant. All these experimental data are presented as means  $\pm$  SEM and were analyzed using Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

### Acknowledgments

We thank Claire Chantaduc, Didier Cathalan and Kévin Chile from ROM Sélection managing the NV and BMC populations, for their precious help in the planning of blood sampling. We are grateful to the breeders who made their animals available for this study. LC was supported by a PhD grant co-funded by APIS-GENE through the Proligen project and the European Funds for Regional Development (FEDER) through the Interreg POCTEFA programme in the framework of the PIRINNOVI project (EFA103/15). Part of the NV sampling was supported by the DEGERAM project co-funded by the FEDER Massif Central, the Régions: Aquitaine, Midi- Pyrénées, Limousin and Auvergne; and the French government.

### References

1. Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update*. 2014;20: 869–883. doi:10.1093/humupd/dmu036
2. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. *Mol Endocrinol*. 1999;13: 1035–1048. doi:10.1210/mend.13.6.0310
3. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 2001;15: 854–866. doi:10.1210/mend.15.6.0662
4. Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, et al. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87: 1337–1344. doi:10.1210/jcem.87.3.8316
5. Wei L-N, Huang R, Li L-L, Fang C, Li Y, Liang X-Y. Reduced and delayed expression of GDF9 and BMP15 in ovarian tissues from

- women with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31: 1483–1490. doi:10.1007/s10815-014-0319-8
6. Morón FJ, de Castro F, Royo JL, Montoro L, Mira E, Sáez ME, et al. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict over-response to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16: 485–495. doi:10.1097/01.fpc.0000215073.44589.96
  7. Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online.* 2011;23: 97–104. doi:10.1016/j.rbmo.2011.02.015
  8. Palmer JS, Zhao ZZ, Hoekstra C, Hayward NK, Webb PM, Whiteman DC, et al. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91: 4713–4716. doi:10.1210/jc.2006-0970
  9. Simpson CM, Robertson DM, Al-Musawi SL, Heath DA, McNatty KP, Ritter LJ, et al. Aberrant GDF9 expression and activation are associated with common human ovarian disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99: E615–624. doi:10.1210/jc.2013-3949
  10. Abdoli R, Zamani P, Mirhoseini SZ, Ghavi Hosseini-Zadeh N, Nadri S. A review on prolificacy genes in sheep. *Reprod Domest Anim Zuchthyg.* 2016;51: 631–637. doi:10.1111/rda.12733
  11. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 2000;25: 279–283. doi:10.1038/77033
  12. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (Ovis aries)1. *Biol Reprod.* 2004;70: 900–909. doi:10.1095/biolreprod.103.023093
  13. Silva BDM, Castro EA, Souza CJH, Paiva SR, Sartori R, Franco MM, et al. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Anim Genet.* 2004;25: 89–92. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x
  14. Demars J, Fabre S, Sarry J, Rossetti R, Gilbert H, Persani L, et al. Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genet.* 2013;9: e1003482. doi:10.1371/journal.pgen.1003482
  15. Chantepie L, Bodin L, Sarry J, Woloszyn F, Ruesche J, Drouilhet L, et al. Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du Velay and Mouton Vendéen sheep breeds. *Livest Sci.* 2018;216: 44–50. doi:10.1016/j.livsci.2018.07.007
  16. Drouilhet L, Mansanet C, Sarry J, Tabet K, Bardou P, Woloszyn F, et al. The Highly Prolific Phenotype of Lacaune Sheep Is Associated with an Ectopic Expression of the B4GALNT2 Gene within the Ovary. *PLoS Genet.* 2013;9: e1003809. doi:10.1371/journal.pgen.1003809
  17. Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, et al. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology.* 2007;148: 393–400. doi:10.1210/en.2006-0764
  18. Wilson T, Wu XY, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod.* 2001;64: 1225–1235.
  19. Talebi R, Ahmadi A, Afraz F, Sarry J, Plisson-Petit F, Genêt C, et al. Transcriptome analysis of ovine granulosa cells reveals differences between small antral follicles collected during the follicular and luteal phases. *Theriogenology.* 2018;108: 103–117. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.11.027
  20. Davis GH, Galloway SM, Ross IK, Gregan SM, Ward J, Nimbkar BV, et al. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biol Reprod.* 2002;66: 1869–1874. doi:10.1095/biolreprod66.6.1869
  21. Mullen MP, Hanrahan JP, Howard DJ, Powell R. Investigation of prolific sheep from UK and Ireland for evidence on origin of the mutations in BMP15 (FecX(G), FecX(B)) and GDF9 (FecG(H)) in Belclare and Cambridge sheep. *PLoS One.* 2013;8: e53172. doi:10.1371/journal.pone.0053172
  22. Jemaa SB, Ruesche J, Sarry J, Woloszyn F, Lassoued N, Fabre S. The high prolificacy of D'man sheep is associated with the segregation of the FecLL mutation in the B4GALNT2 gene. *Reprod Domest Anim.* 2018;0. doi:10.1111/rda.13391
  23. Rochus CM, Tortereau F, Plisson-Petit F, Restoux G, Moreno-Romieux C, Tosser-Klopp G, et al. Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. *BMC Genomics.* 2018;19. doi:10.1186/s12864-018-4447-x
  24. Bonnet A, Cabau C, Bouchez O, Sarry J, Marsaud N, Foissac S, et al. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. *BMC Genomics.* 2013;14: 904. doi:10.1186/1471-2164-14-904
  25. Martinez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JJ, Alabart JL, Roche A, et al. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Anim Genet.* 2008;29: 294–297. doi:10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x
  26. Lassoued N, Benkhilil Z, Woloszyn F, Rejeb A, Aouina M, Rekiq M, et al. FecX Bar a Novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep. *BMC Genet.* 2017;18: 43. doi:10.1186/s12863-017-0510-x
  27. Liao WX, Moore RK, Shimasaki S. Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *J Biol Chem.* 2004;279: 17391–17396. doi:10.1074/jbc.M401050200
  28. Wan Q, Wang Y, Wang H. Identification and Analysis of Regulatory Elements in Porcine Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Promoter. *Int J Mol Sci.* 2015;16: 25759–25772. doi:10.3390/ijms161025759
  29. Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet.* 2006;119: 408–415. doi:10.1007/s00439-006-0150-0
  30. Fonseca DJ, Ortega-Recalde O, Esteban-Perez C, Moreno-Ortiz H, Patiño LC, Bermúdez OM, et al. BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 2014;29: 627–633. doi:10.1016/j.rbmo.2014.07.018
  31. McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL, O'Connell A, et al. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol.* 2005;37: S25. doi:10.1186/1297-9686-37-S1-S25
  32. Bonnet A, Bevilacqua C, Benne F, Bodin L, Cotinot C, Liaubet L, et al. Transcriptome profiling of sheep granulosa cells and oocytes during early follicular development obtained by laser capture microdissection. *BMC Genomics.* 2011;12: 417. doi:10.1186/1471-2164-12-417
  33. Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Persani L, et al. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 2006;4: 20. doi:10.1186/1477-7827-4-20



34. Jansson T. Genes involved in ovulation rate and litter size in sheep [Internet]. SLU, Departement of Clinical sciences; 2014. Available: <https://stud.epsilon.slu.se/6803/>

35. Martin P, Raoul J, Bodin L. Effects of the *FecL* major gene in the Lacaune meat sheep population. *Genet Sel Evol GSE*. 2014;46: 48. doi:10.1186/1297-9686-46-48

36. Kumar S, Mishra AK, Kolte AP, Arora AL, Singh D, Singh VK. Effects of the Booroola (*FecB*) genotypes on growth performance, ewe's productivity efficiency and litter size in GarolexMalpura sheep. *Anim Reprod Sci*. 2008;105: 319–331. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.012

37. Demars J, Cano M, Drouilhet L, Plisson-Petit F, Bardou P, Fabre S, et al. Genome-Wide Identification of the Mutation Underlying Fleece Variation and Discriminating Ancestral Hairy Species from Modern Woolly Sheep. *Mol Biol Evol*. 2017;34: 1722–1729. doi:10.1093/molbev/msx114

38. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29: 24–26. doi:10.1038/nbt.1754

39. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011;43: 491–498. doi:10.1038/ng.806

40. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma Ed Board Andreas Baxeavanis Al*. 2013;11: 11.10.1-11.10.33. doi:10.1002/0471250953.bi1110s43

41. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26: 509–515.

42. Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet*. 2006;7: 781–791. doi:10.1038/nrg1916

43. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*. 2015;4: 7. doi:10.1186/s13742-015-0047-8

44. Scheet P, Stephens M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Am J Hum Genet*. 2006;78: 629–644. doi:10.1086/502802

45. Poivey J-P, Tiphine L, Berny B, Julien E. Indexation blup modèle animal chez les ovins allaitants. *Rencontres Recherches Ruminants*. 1995. pp. 453–456. Available: [http://www.journees3r.fr/IMG/pdf/1995\\_8\\_actualite\\_01\\_poivey.pdf](http://www.journees3r.fr/IMG/pdf/1995_8_actualite_01_poivey.pdf)

46. Glimour A, Gogel B, Cullis B, Thompson R. R: ASReml User-Guide Release 3.0. VSN [Internet]. VSN International; 2009. Available: <https://asreml.kb.vsnr.co.uk/wp-content/uploads/sites/3/2018/02/ASReml-3-User-Guide.pdf>

S3 Figure Genome-wide and chromosome-wide association results integrating the SNP OARX: 50977717T>A.

**S2 Table. List of primers used in the study. Locations of primers are based on the OARv3.1 ovine genome assembly available on ensembl.org.**

Gene	Primer sequence	Position (start, bp) or accession number	Application
BMP15	TGGAAAGTAGGGTGGGAACAG	50977851	Terra PCR <i>FecX</i> <sup>1</sup>
	CACAAAGGATAGGGCAAGGA	50977530	
	GTCATGGTACCTGGAAATAGGGTGGGAACAG	50977851	Plasmid construction BMP15 promoter
	TGAAAAGCTTCACAAAGGATAGGGCAAGGA	50977530	
	CCCACACAGAATCTAAACACC	50978310	
	GAGGCCCTTGCTACACTAGCC	50977109	
	CCTTTTAAATACGATCTTGTTC	50978310	cDNA PCR amplification full length
	CCTTTTATATACGATCTTGTTC	50978310	
	GTCACCTGTCATGTGCAGGACTG	50977109	
	GTCAAGCAGGCAGTATTG	50971300	quantitative PCR
AGAATTGAGACCATAGTGTAGTA	50971115		
B4GALNT2	CACAAAGGATAGGGCAAGGA	50977530	Sequencing
	ACTTTTCTTCCCAATTTCTCC	50977044	
	GAGGGAACAAGAGCAAAGCG	50971807	
	GGCAATCATACCTCATACTCC	50970959	
	TGGTTCAAACCTCTACATGCAAGA	36938189	Terra PCR <i>FecL</i> <sup>2</sup>
	TATGCATGGCATGTGATAGG	36938314	
	TATGCATGGCATGTGATAGG	36938314	KASP PCR <i>FecL</i> <sup>2</sup>
	GCAAGAAAGCTGCGTGTT	36938207	
	GCAAGAAAGCTGCGTGTA	36938207	
	GDF9	CATTTCCCATACCAAGTCTTC	41843543
CCAATCTGCTCCACACACCT		41843102	
AAAACAATCCAAAGTAATGCCA		41842008	quantitative PCR
GCTCCTCCTTACACAACACACAG		41840902	
GAPDH	TAGTCAGCTGAAGTGGACA	41841090	quantitative PCR
	AGCCATCAAGCTCGATGGCC	41841294	
SDHA	CGACTTCAACAGCGACACTC	NM_001190390	quantitative PCR
	CAATGAAATTCGGCTACAGCA		
SDHA	GAATGGTCTGGAAACACTG	XM_012125144	
	AGTAATCGTACTCGTCAAC		

<sup>1</sup>Start positions of primers (in base pair) localized on the OARv3.1 ovine genome assembly

## Supporting information

S1 Table. List of variants found in the OARX: 50639087-54114793 region. 60 SNPs and 90 small INDELs with quality score >30 were detected.

S2 Table. List of primers used in the study. Locations of primers are based on the OARv3.1 ovine genome assembly available on ensembl.org.

**S1 Table. List of variants found in the OARX: 50639087-54114793 region. 60 SNPs and 90 small INDELS with quality score >30 were detected.**

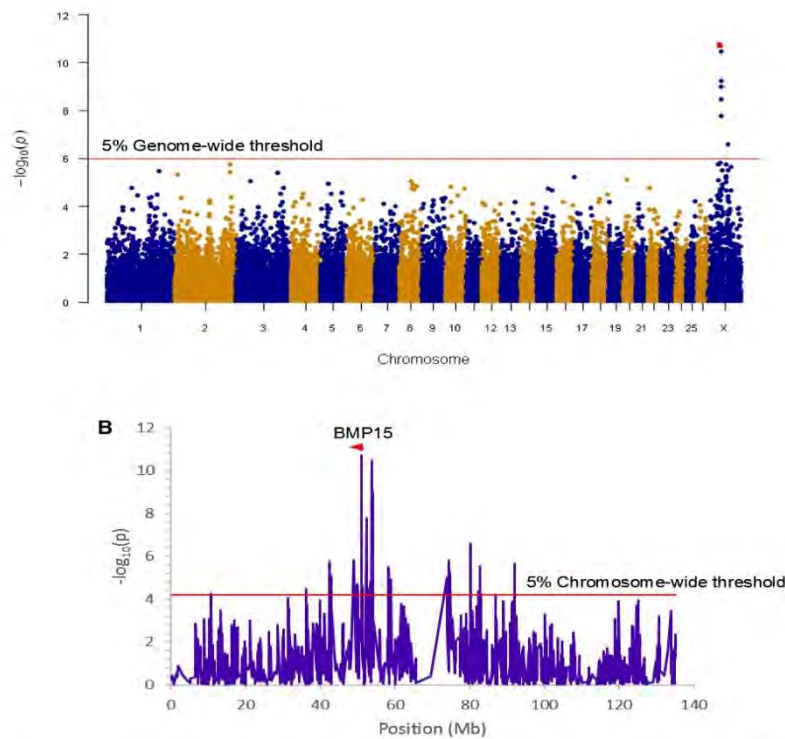
Position on OAR X	Gene	Mutation type	QUAL	Localisation	Potential impact
50683780	GSPT2-ENSOARG00000005651	InDel	260.8	intergenic_region	MODIFIER
50683788	GSPT2-ENSOARG00000005651	InDel	260.8	intergenic_region	MODIFIER
50684673	GSPT2-ENSOARG00000005651	SNP	64.62	intergenic_region	MODIFIER
50685195	GSPT2-ENSOARG00000005651	SNP	180.6	intergenic_region	MODIFIER
50774266	ENSOARG00000005651-ENSOARG00000009353	SNP	332.1	intergenic_region	MODIFIER
50776441	ENSOARG00000005651-ENSOARG00000009353	SNP	242.1	intergenic_region	MODIFIER
50790680	ENSOARG00000009353	InDel	225.0	downstream_gene	MODIFIER
50791527	ENSOARG00000009353	SNP	98.3	downstream_gene	MODIFIER
50808732	ENSOARG00000009353-CXorf67	SNP	108.7	intergenic_region	MODIFIER
50850358	CXorf67-ENSOARG00000005667	InDel	108.7	intergenic_region	MODIFIER
50925461	ENSOARG00000005667-BMP15	SNP	67.3	intergenic_region	MODIFIER
50936876	ENSOARG00000005667-BMP15	SNP	217.5	intergenic_region	MODIFIER
50960665	ENSOARG00000005667-BMP15	SNP	426.1	intergenic_region	MODIFIER
50967353	BMP15	InDel	258.4	downstream_gene	MODIFIER
50977717	BMP15	SNP	185.9	upstream_gene	MODIFIER
51169689	ENSOARG00000005682-SHROOM4	InDel	600.4	intergenic_region	MODIFIER
51171209	ENSOARG00000005682-SHROOM4	SNP	63.41	intergenic_region	MODIFIER
51171228	ENSOARG00000005682-SHROOM4	SNP	61.38	intergenic_region	MODIFIER
51187703	SHROOM4	InDel	236.4	upstream_gene	MODIFIER
51187721	SHROOM4	SNP	284.5	upstream_gene	MODIFIER
51209024	SHROOM4	InDel	48.85	intron_variant	MODIFIER
51218821	SHROOM4	InDel	428.1	intron_variant	MODIFIER
51274978	SHROOM4	SNP	179.5	intron_variant	MODIFIER
51309476	SHROOM4	InDel	183.1	intron_variant	MODIFIER
51311142	SHROOM4	InDel	141.8	intron_variant	MODIFIER
51373045	SHROOM4	InDel	283.4	intron_variant	MODIFIER
51384668	U6	SNP	64.14	upstream_gene	MODIFIER
51410216	SHROOM4	SNP	193.4	intron_variant	MODIFIER
51430073	SHROOM4	SNP	271.4	intron_variant	MODIFIER
51498805	ENSOARG00000009517	InDel	52.98	splice_acceptor& splice_donor& intron_variant	HIGH
51597462	ENSOARG00000009561	InDel	370.4	downstream_gene	MODIFIER
51628714	ENSOARG00000009561-DGKK	InDel	165.9	intergenic_region	MODIFIER
51669479	ENSOARG00000009561-DGKK	InDel	151.4	intergenic_region	MODIFIER
51712754	DGKK	InDel	435.4	intron_variant	MODIFIER
51746018	DGKK	InDel	228.9	intron_variant	MODIFIER
51820552	DGKK	SNP	665.4	intron_variant	MODIFIER
51824476	DGKK	SNP	44.95	intron_variant	MODIFIER
51830181	DGKK	InDel	78.91	intron_variant	MODIFIER
51830183	DGKK	InDel	82.28	intron_variant	MODIFIER
51830185	DGKK	InDel	82.28	intron_variant	MODIFIER
51862972	DGKK	SNP	267.8	intron_variant	MODIFIER
51872169	DGKK-CCNB3	InDel	396.3	intergenic_region	MODIFIER
51898542	CCNB3	SNP	37.42	intron_variant	MODIFIER
51964533	AKAP4	InDel	87.55	intron_variant	MODIFIER

52059459	AKAP4-CLC5	InDel	498.8	intergenic_region	MODIFIER
52123748	CLC5	SNP	30.88	intron_variant	MODIFIER
52151774	ENSOARG00000021616	SNP	46.18	downstream_gene	MODIFIER
52157764	ENSOARG00000021616	InDel	166.1	upstream_gene	MODIFIER
52194284	CLC5	SNP	103.9	intron_variant	MODIFIER
52194285	CLC5	SNP	103.9	intron_variant	MODIFIER
52194287	CLC5	SNP	103.9	intron_variant	MODIFIER
52194292	CLC5	InDel	93.97	intron_variant	MODIFIER
52194293	CLC5	InDel	93.97	intron_variant	MODIFIER
52195091	CLC5	SNP	184.9	intron_variant	MODIFIER
52198430	CLC5	SNP	126.5	intron_variant	MODIFIER
52200617	CLC5	InDel	266.4	intron_variant	MODIFIER
52231408	CLC5	InDel	115.8	intron_variant	MODIFIER
52232868	CLC5	SNP	183.5	intron_variant	MODIFIER
52242121	CLC5	InDel	96.4	intron_variant	MODIFIER
52252970	CLC5	InDel	182.4	intron_variant	MODIFIER
52296947	CLC5-USP27X	SNP	303.4	intergenic_region	MODIFIER
52315094	CLC5-USP27X	SNP	135.4	intergenic_region	MODIFIER
52385758	USP27X-PPP1R3F	InDel	46.1	intergenic_region	MODIFIER
52388718	USP27X-PPP1R3F	InDel	204.2	intergenic_region	MODIFIER
52398685	USP27X-PPP1R3F	InDel	398.1	intergenic_region	MODIFIER
52419154	USP27X-PPP1R3F	InDel	246.4	intergenic_region	MODIFIER
52435375	USP27X-PPP1R3F	InDel	92.8	intergenic_region	MODIFIER
52435376	USP27X-PPP1R3F	InDel	92.8	intergenic_region	MODIFIER
52442635	USP27X-PPP1R3F	InDel	290.8	intergenic_region	MODIFIER
52442742	USP27X-PPP1R3F	InDel	99.1	intergenic_region	MODIFIER
52449513	USP27X-PPP1R3F	InDel	249.8	intergenic_region	MODIFIER
52450227	USP27X-PPP1R3F	SNP	126.8	intergenic_region	MODIFIER
52462574	USP27X-PPP1R3F	InDel	217.5	intergenic_region	MODIFIER
52471415	USP27X-PPP1R3F	SNP	595.6	intergenic_region	MODIFIER
52488251	USP27X-PPP1R3F	InDel	97.26	intergenic_region	MODIFIER
52488253	USP27X-PPP1R3F	InDel	97.26	intergenic_region	MODIFIER
52488257	USP27X-PPP1R3F	InDel	97.26	intergenic_region	MODIFIER
52488261	USP27X-PPP1R3F	SNP	107.3	intergenic_region	MODIFIER
52488265	USP27X-PPP1R3F	SNP	107.3	intergenic_region	MODIFIER
52503680	USP27X-PPP1R3F	InDel	321.1	intergenic_region	MODIFIER
52505651	USP27X-PPP1R3F	InDel	184.1	intergenic_region	MODIFIER
52571083	USP27X-PPP1R3F	InDel	265.4	intergenic_region	MODIFIER
52572019	USP27X-PPP1R3F	InDel	55.91	intergenic_region	MODIFIER
52572022	USP27X-PPP1R3F	InDel	55.91	intergenic_region	MODIFIER
52592521	PPP1R3F	InDel	84.79	intron_variant	MODIFIER
52634032	CACNA1F	SNP	95.3	upstream_gene	MODIFIER
52648352	CACNA1F	SNP	85.26	intron_variant	MODIFIER
52688623	PRICKLE3	SNP	85.18	synonymous_variant	LOW
52694287	PLP2	InDel	240.8	upstream_gene	MODIFIER
52694288	PLP2	InDel	240.8	upstream_gene	MODIFIER
52699828	MAGIX	InDel	108.4	intron_variant	MODIFIER
52716181	MAGIX-GPKOW	InDel	150.8	intergenic_region	MODIFIER

52718549	MAGIX-GPKOW	SNP	342.8	intergenic_region	MODIFIER
52730466	GPKOW	InDel	115.5	intron_variant	MODIFIER
52753089	WDR45	InDel	93.97	upstream_gene	MODIFIER
52758130	PRAF2	SNP	148.6	upstream_gene	MODIFIER
52759563	WDR45	SNP	173.9	downstream_gene	MODIFIER
52815648	TFE3-GRIPAP1	SNP	232.1	intergenic_region	MODIFIER
52951821	TIMM17B-PCSK1N	InDel	141.4	intergenic_region	MODIFIER
53000172	GATA1	InDel	367.1	downstream_gene	MODIFIER
53013209	GLOD5	InDel	150.4	downstream_gene	MODIFIER
53036028	GLOD5-SUV39H1	InDel	273.8	intergenic_region	MODIFIER
53037226	GLOD5-SUV39H1	InDel	81.34	intergenic_region	MODIFIER
53050317	GLOD5-SUV39H1	SNP	277.4	intergenic_region	MODIFIER
53066679	GLOD5-SUV39H1	SNP	278.4	intergenic_region	MODIFIER
53067496	GLOD5-SUV39H1	InDel	270.4	intergenic_region	MODIFIER
53073894	GLOD5-SUV39H1	InDel	58.41	intergenic_region	MODIFIER
53094340	GLOD5-SUV39H1	InDel	105.8	intergenic_region	MODIFIER
53111357	GLOD5-SUV39H1	SNP	249.5	intergenic_region	MODIFIER
53111359	GLOD5-SUV39H1	InDel	510.3	intergenic_region	MODIFIER
53111360	GLOD5-SUV39H1	InDel	510.3	intergenic_region	MODIFIER
53119614	SUV39H1	SNP	302.4	downstream_gene	MODIFIER
53155055	WAS-U6	InDel	218.8	intergenic_region	MODIFIER
53157293	WAS-U6	InDel	421.1	intergenic_region	MODIFIER
53160590	WAS-U6	InDel	577.1	intergenic_region	MODIFIER
53172125	U6	InDel	389.4	upstream_gene	MODIFIER
53175489	U6-WDR13	InDel	89.17	intergenic_region	MODIFIER
53180238	U6-WDR13	InDel	245.4	intergenic_region	MODIFIER
53183532	U6-WDR13	InDel	705.4	intergenic_region	MODIFIER
53192147	WDR13	InDel	232.5	downstream_gene	MODIFIER
53203613	WDR13	SNP	490.8	upstream_gene	MODIFIER
53203614	WDR13	InDel	481.8	upstream_gene	MODIFIER
53206594	WDR13-RBM3	InDel	96.52	intergenic_region	MODIFIER
53215298	RBM3	InDel	54.18	intron_variant	MODIFIER
53226133	TBC1D25	InDel	173.4	downstream_gene	MODIFIER
53248717	EBP	SNP	297.4	upstream_gene	MODIFIER
53261035	PORCN	SNP	207.2	upstream_gene	MODIFIER
53280331	PORCN-ENSOARG00000012432	InDel	92.81	intergenic_region	MODIFIER
53297224	ENSOARG00000012432	InDel	344.3	downstream_gene	MODIFIER
53305639	ENSOARG00000012432	InDel	997.3	upstream_gene	MODIFIER
53324140	SLC38A5	SNP	179.6	downstream_gene	MODIFIER
53324711	SLC38A5	InDel	297.4	downstream_gene	MODIFIER
53355540	ENSOARG00000012563-ENSOARG00000012572	SNP	236.9	intergenic_region	MODIFIER
53372958	ENSOARG00000012572-ZNF81	InDel	56.76	intergenic_region	MODIFIER
53382059	ENSOARG00000012572-ZNF81	SNP	213.2	intergenic_region	MODIFIER
53438078	ZNF81-ZNF182	InDel	295.4	intergenic_region	MODIFIER
53522359	ENSOARG00000012661-ENSOARG00000005755	SNP	278.1	intergenic_region	MODIFIER
53559196	ENSOARG00000012661-ENSOARG00000005755	SNP	32.02	intergenic_region	MODIFIER
53572746	ENSOARG00000012661-ENSOARG00000005755	SNP	115.7	intergenic_region	MODIFIER
53670633	ENSOARG00000012770-ENSOARG00000012779	SNP	334.6	intergenic_region	MODIFIER

53734133	ENSOARG00000012779-UXT	InDel	328.8	intergenic_region	MODIFIER
53734260	ENSOARG00000012779-UXT	InDel	218.9	intergenic_region	MODIFIER
53898797	5S_rRNA	SNP	146.9	upstream_gene	MODIFIER
53917170	5S_rRNA-ZNF41	InDel	104.8	intergenic_region	MODIFIER
53939528	5S_rRNA-ZNF41	SNP	365.4	intergenic_region	MODIFIER
53992481	ZNF41	InDel	91.85	downstream_gene	MODIFIER
54070439	ZNF157	SNP	215.6	upstream_gene	MODIFIER
54113756	ZNF157-ENSOARG00000005782	InDel	602.1	intergenic_region	MODIFIER
54113759	ZNF157-ENSOARG00000005782	SNP	611.1	intergenic_region	MODIFIER
54113769	ZNF157-ENSOARG00000005782	InDel	621.4	intergenic_region	MODIFIER

**S3 Figure. Genome-wide and chromosome-wide association results integrating the SNP OARX: 50977717T>A.**



(A) Genome-wide association results for litter size in the NV sheep population. Manhattan plot shows the combined association signals ( $-\log_{10}(p\text{-value})$ ) on the y-axis versus SNPs position in the sheep genome on the x-axis and ordered by chromosome number (assembly OARv3.1). Red line represents the 5% genome-wide threshold. (B) OARX chromosome-wide association results. The curve shows the combined association signals ( $-\log_{10}(p\text{-value})$ ) on the y-axis versus SNPs position on the X chromosome on the x-axis (assembly OARv3.1). Red line represents the 5% chromosome-wide threshold. In both panels, the position of the SNP OARX:50977717T>A is indicated by a red dot. In panel (B), the *BMP15* gene location is indicated by a red arrowhead.

Tableau 20 : Première estimation de la fréquence et effet brute de la mutation FecX<sup>N</sup> en Belle-Île.

	+/+	N/+	N/N	N/+	N/Y
<i>Effectif</i>	37	19	2	1	1
<i>Prolificité moyenne</i>	2,22 (n=13)	2,11 (n=12)	2,33 (n=2)		

Tableau 21 : Effectif et effet brute de la mutation FecX<sup>N</sup> sur la totalité de la population Belle-Île.

	+/+		N/+		N/N		Total	
	n	Prolif	n	Prolif	n	Prolif	n	Prolif
<i>Élevage 1</i>	10	1,65	21	1,71	10	1,90	41	1,74
<i>Élevage 2</i>	19	1,85	31	2,10	1	2,50	51	2,01
<i>Élevage 3</i>	5	2,20					5	2,20
<i>Élevage 4</i>	20	1,69	5	1,68			25	1,69
<i>Élevage 5</i>	3	2,00	13	2,29	3	3,44	19	2,43
<i>Élevage 6</i>	3	2,22	5	2,03			8	2,10
<i>Total</i>	60	1,82	75	1,99	14	2,27	149	1,95

## B. Population Belle-Île

L'hypothèse de ségrégation d'une mutation à effet majeur sur la prolificité dans la population Belle-Île a été posée dès 1998 par Malher and Le Chère, les portées de 3 à 4 agneaux étant courantes. L'association « Denved ar vro-moutons » des pays de Bretagne a été créée en 2004 dans le but de sauvegarder et valoriser les races Belle-île et Landes de Bretagne. En collaboration avec cette association, un premier échantillonnage de 62 brebis et deux béliers a été réalisé. L'approche mutation candidate a été préférée avec le génotypage des mutations qui ségrégent en France *FecB<sup>B</sup>*, *FecL<sup>L</sup>*, *FecX<sup>L</sup>*, *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecX<sup>N</sup>*. Parmi les 64 échantillons, seule la mutation *FecX<sup>N</sup>* est retrouvée à l'état hétérozygote chez 19 brebis et à l'état homozygote mutant chez 2 brebis ainsi qu'un mâle hémizygote (Tableau 20), soit une fréquence de l'allèle *FecX<sup>N</sup>* de 17,9%. J'avais à ma disposition l'enregistrement de la taille de portée pour 27 brebis dont la moyenne de prolificité est de 1,90 [entre 1 et 7].

Fort de ce résultat, la totalité de la population a été prélevée soit 243 animaux dans 6 élevages. Les enregistrements de taille de portée et de paternité sont peu suivis car il s'agit pour la plupart d'élevages amateurs avec peu d'animaux et j'avais donc à ma disposition des données de prolificité pour 149 brebis. J'ai pu estimer la fréquence allélique de la mutation *FecX<sup>N</sup>* à 34,6%. Globalement, la présence d'une copie de l'allèle N fait augmenter la prolificité de +0,20 agneau par mise bas (Tableau 21). Concernant les béliers, un seul est hémizygote N/Y parmi les 7 prélevés.

## C. Population Lacaune

La race Lacaune du rameau viande est connue pour avoir deux mutations qui ségrégent, *FecL<sup>L</sup>* (Drouilhet et al., 2009, 2013) et *FecX<sup>L</sup>* (Bodin et al., 2007). Cependant, l'hypothèse d'un troisième gène a été posée suite à l'identification de brebis hyper prolifiques mais non porteuses de ces deux mutations (Tableau 6 page 49). Dans le cadre du projet PIRINNOVI, nous avons projeté de réaliser une approche tout génome avec l'utilisation d'une puce SNPs haute densité 600k (Illumina), et des brebis non porteuses de *FecL<sup>L</sup>* et de *FecX<sup>L</sup>* ont été sélectionnées sur la base de leur prolificité moyenne sur œstrus naturel et sur au moins 3 mises bas. La sélection s'est portée sur 44 brebis peu prolifiques (prolificité moyenne entre 1 et 1,33 agneau par mise bas) et 127 très prolifiques (prolificité moyenne entre 1,67 et 4 agneaux par mise bas). Dans le même temps, suite aux recherches menées pour le deuxième gène en race Noire du Velay (Article II en page 75), j'ai testé la présence de la mutation *FecX<sup>N</sup>* sur le panel de diversité (Rochus et al., 2018).

Tableau 22 : Tableau de contingence de la mutation FecX<sup>N</sup> chez les brebis Lacaune sélectionnées pour le GWAS.

<i>Groupe / génotype</i>	<i>Effectifs</i>	<i>Moyenne de Pron</i>
<b><i>basse</i></b>	<b>44</b>	<b>1,04</b>
<i>+/+</i>	17	1,07
<b><i>haute</i></b>	<b>127</b>	<b>2,78</b>
<i>+/+</i>	49	2,79
<i>N/+</i>	18	2,79
<i>N/N</i>	5	3,43
<b><i>Total général</i></b>	<b>171</b>	<b>2,33</b>

Pron : prolificité sur œstrus naturel



Dans ce panel, 42 brebis Lacaune viande étaient présentes et 2 d'entre elles se sont avérées hétérozygotes  $FecX^N/FecX^+$ , confirmant l'hypothèse de la ségrégation d'une troisième mutation.

J'ai réalisé le génotypage par PCR-RFLP (PE 3) sur les échantillons recueillis pour l'analyse d'association (n=171). Aucune brebis appartenant au groupe non prolifique (basse) n'est porteuse de la mutation  $FecX^N$ , alors que 23 brebis sont porteuses parmi les très prolifiques (haute) (Tableau 22). À la suite de ces résultats, j'ai également réalisé le génotypage de l'ensemble des mâles du centre d'IA, soit 117 béliers. 10 béliers sont hémizygotés  $FecX^N/Y$  et ils transmettent la mutation à toutes leurs filles.

Il ne m'a pas encore été possible d'estimer ni la fréquence ni l'effet de la mutation dans ce cadre, l'échantillonnage étant biaisé. Ce résultat arrivant tardivement au cours de ma thèse, les travaux seront poursuivis ensuite en collaboration avec OVI-TEST.

#### D. Population Rasa Aragonesa

Dans le cadre du parcours Agreenium EIR-A et du projet PIRINNOVI, j'ai eu la chance de collaborer avec le CITA (Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón Zaragoza, Espagne) et d'aller en mobilité au sein du laboratoire « Producción y Sanidad Animal » durant 3 mois. J'ai travaillé sur la recherche d'un deuxième gène de prolificité au sein de la race Rasa Aragonesa. La Coopérative Oviaragon Grupo Pastores réalise depuis 1994 un programme de sélection pour la prolificité de cette race, avec 490 337 brebis contrôlées actuellement et gère la mutation de prolificité  $FecX^R$  (aussi appelée ROA) dans le gène *BMP15* (Martinez-Royo et al., 2008). Ce polymorphisme entraîne une prolificité accrue chez les hétérozygotes (+0,35 agneau par mises-bas sur œstrus naturel), mais de la stérilité chez des brebis homozygotes. Comme dans les autres races que j'ai pu étudier précédemment, des brebis très prolifiques non porteuses de l'allèle  $FecX^R$  ont été retrouvées dans la population et particulièrement dans la descendance d'un même bélier. Les filles prolifiques de ce mâle ont été séquencées pour les 4 gènes connus pour affecter la prolificité, mais aucun polymorphisme causal n'a été identifié (J. Calvo, communication personnelle). L'équipe du CITA a donc engagé une approche tout génome afin de vérifier l'hypothèse de la ségrégation d'une nouvelle mutation.

Mutation FecXGr (NM-001114767.1 : c.950 C>T)

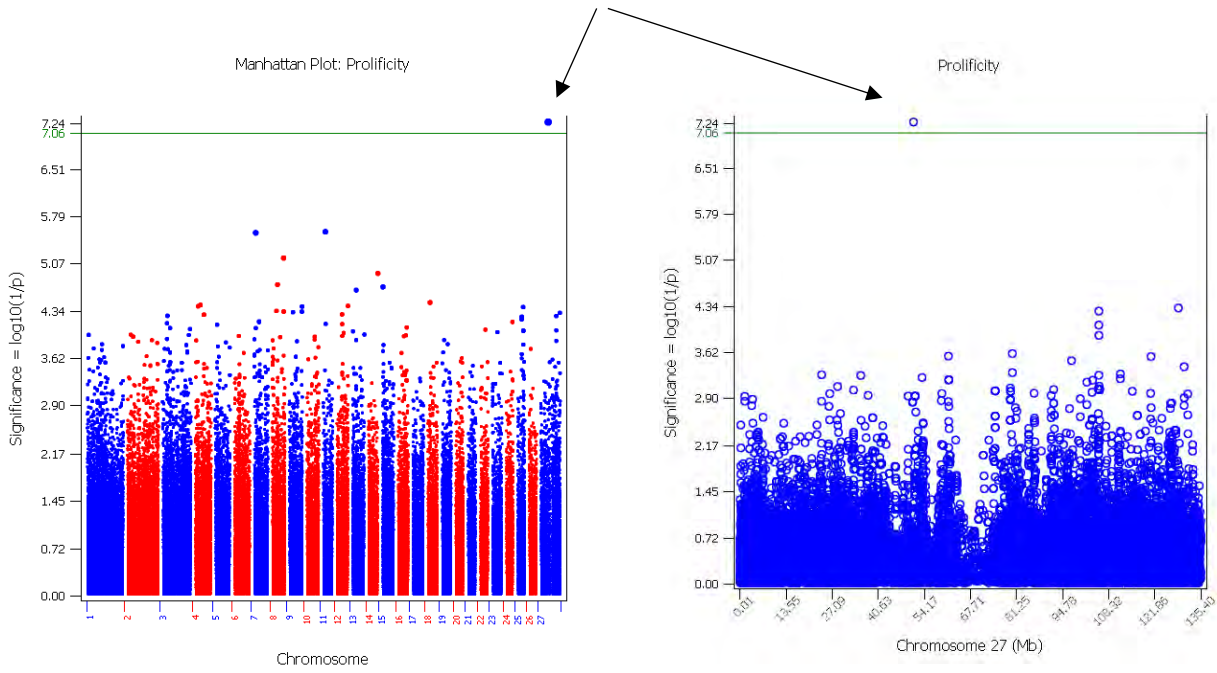


Figure 62: Résultat de l'analyse d'association pour la race Rasa Aragonesa au niveau génomique et chromosomique.

Tableau 23 : Tableau de contingence pour la mutation FecX<sup>Gr</sup> en Rasa Aragonesa.

Génotype / groupe	Effectif	Prolificité ON
<b>Gr/+</b>	<b>13</b>	<b>2.41</b>
Haute	13	2.41
<b>+/+</b>	<b>159</b>	<b>1.54</b>
Haute	74	2.10
Basse	85	1.06
<b>Total général</b>	<b>172</b>	<b>1.61</b>

ON : œstrus naturel

Tableau 24 : Fréquences des mutations FecX<sup>Gr</sup> et FecX<sup>R</sup> dans 4 élevages Rasa Aragonesa.

	Prolificité	FecX <sup>Gr</sup> /FecX <sup>+</sup>	FecX <sup>R</sup> /FecX <sup>+</sup>
Élevage n°1	1,47	0,02	0,28
Élevage n°2	1,50	0,01	0,02
Élevage n°3	1,72	0,0015	0,58
Élevage n°4	1,38	0	0,02

## 1) Analyse génétique d'association génome complet

Pour l'analyse d'association GWAS, l'équipe du CITA a retenu 158 brebis génotypées à l'aide d'une puce de génotypage SNP haute densité (Illumina AgResearch Sheep HD 680K). Ces brebis ont une prolificité moyenne de 1,6 agneaux par mise-bas mais avec des animaux extrêmes allant de 1,0 à 2,7. Elles ont été choisies le moins apparenté possible dans 69 élevages différents grâce à la base de données de la coopérative Oviaragon-Grupo Pastores. Les brebis avaient au moins trois mises-bas enregistrées (sans distinction d'œstrus naturel ou d'œstrus induit par la PMSG) et elles sont non porteuses de l'allèle *FecX<sup>R</sup>*.

Dans le cadre de mon séjour, j'ai réalisé l'analyse d'association avec le logiciel PLINK selon le modèle de phénotype quantitatif (PE 4). Suite aux différents filtres, l'analyse a porté sur 576 086 SNPs informatifs chez l'ensemble des 158 individus. J'ai trouvé une association significative au niveau génomique ( $p_{\text{Bonferroni}} < 0,05$ ) pour un unique SNP sur le chromosome X (Figure 62). Il s'agit du marqueur oar3\_OAR27\_50971170\_dup situé dans le gène *BMP15* en position OARX:50971170 (OARv3.1). Ce marqueur correspond à la mutation de prolificité *FecX<sup>Gr</sup>* (NM\_001114767.1: c.950C>T) mise en évidence pour la première fois en race Grivette (Demars et al., 2013), et que j'ai identifiée au cours de ce travail de thèse également en races Mouton Vendéen (Chantepie et al., 2018) et Flemish (Meyermans et al., 2018). En reclassant les brebis selon deux groupes de prolificité, haute et basse, 13 brebis hétérozygotes *FecX<sup>Gr</sup>/FecX<sup>+</sup>* sont trouvées dans le groupe des brebis hautement prolifiques avec une prolificité moyenne de 2,41 agneaux par mise-bas contre seulement 1,54 agneau par mise-bas chez les brebis de génotype sauvage (Tableau 23). La présence de *FecX<sup>Gr</sup>* chez ces brebis a été vérifiée par séquençage du gène *BMP15*.

## 2) Fréquence et effet de *FecX<sup>Gr</sup>* sur la prolificité

Afin de valider la présence de la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* dans la population et estimer sa fréquence et son effet, 3428 brebis Rasa Aragonesa de 4 élevages ont été génotypées par une approche PCR-KASP (Tableau 24). Seulement deux brebis ont été identifiées doubles hétérozygotes pour *FecX<sup>R</sup>* et *FecX<sup>Gr</sup>* et l'effet ne semble pas être additif puisqu'on observe un effet brut de +0,35 sur la prolificité, mais l'effectif est trop faible pour conclure.

## 3) Poster ISAG 2019

# Genome-wide association study (GWAS) identifies the *FecX<sup>Gr</sup>* allele in *BMP15* segregating in Rasa Aragonesa sheep breed

Louise Chantepie<sup>1</sup>, Malena Serrano<sup>2</sup>, María Pilar Sarto<sup>3</sup>, Laura P. Iguacel<sup>3</sup>, M<sup>a</sup> Ángeles Jiménez<sup>2</sup>, José Luis Alabart<sup>3</sup>, José Folch<sup>3</sup>, Belén Lahoz<sup>3</sup>, Stéphane Fabre<sup>1</sup>, Jorge Hugo Calvo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Université de Toulouse, INRA, ONVT, GeopHySE, Centre de Bioe Rouge 31328 Castanet Tolosan, France; <sup>2</sup>Department of Animal Breeding and Genetics, INIA, 28040 Madrid, Spain; <sup>3</sup>ICITA, IRTA, 50059 Zaragoza, Spain; <sup>4</sup>ICITA, ARAD-IA2, 50059 Zaragoza, Spain. Corresponding author: joalvo@genpro.es

The Cooperative Oviaragon-Grupo Pastores carries out since 1994 a selection program for prolificacy in this breed, with 490,337 controlled ewes at present. A *FecX*-mutated allele called *FecX<sup>Gr</sup>* in *BMP15* gene was described in Rasa aragonesa sheep breed. This polymorphism causes increased prolificacy in heterozygous and sterility in homozygous ewes. However, highly prolific ewes without the *FecX<sup>Gr</sup>* allele have been found in the population.

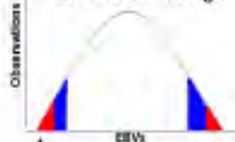
## Objective

Identify new hyperprolific genetic variants in the Rasa Aragonesa sheep breed using a genome-wide association study (GWAS).

## Material and methods

### Sampling

14,000 ewes with at least 3 lambings



EBVs = -0.11 → -0.22  
Prolificacy = 1 → 1.33  
N=204

EBVs = 0.16 → 0.48  
Prolificacy = 1.6 → 3.33  
N=187

### Microarray hybridization

73 high prolific vs. 85 low prolific ewes (Non-related animals)



Illumina AgResearch Sheep HD (680K)

### Association analysis

PLINK and GCTA softwares.

### Validation by Kompetitive allele specific PCR (KASP)

- ✓ 3428 ewes and lambs from 4 farms in Rasa aragonesa.
- ✓ A biodiversity panel of 288 animals from Rasa aragonesa, Navarra, Xisqueta, Ansotana, Ojinegra, Cartera, Maellana, Churra Tenaina, Roya bilbiliana breeds.

### Double heterozygous studies

Cloning and sequencing: Two double heterozygous animals for *FecX<sup>Gr</sup>* and *FecX<sup>Gr</sup>* alleles.

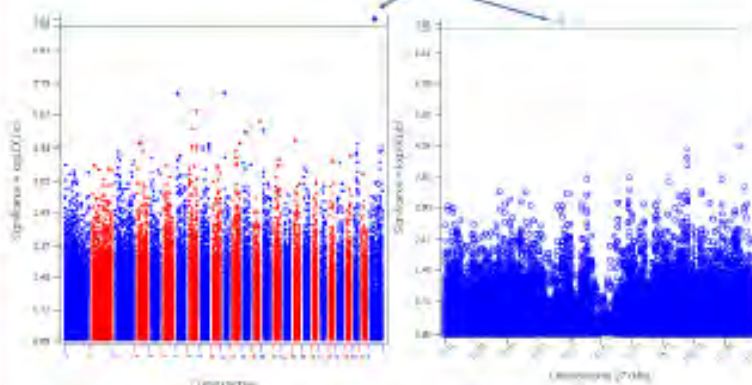
## Conclusions

The *FecX<sup>Gr</sup>* mutation (NM\_001114767.1: c.950C>T) associated with increased prolificacy in other sheep breeds is segregating in Rasa aragonesa sheep breed. The selection program for prolificacy should implement the genotyping of reproducers for the *FecX<sup>Gr</sup>* allele, to know its frequency and the size of its effects to be able to undertake decisions about its management.

## Results

### Manhattan plot : Prolificacy

The *FecX<sup>Gr</sup>* allele (NM\_001114767.1: c.950C>T)



- ✓ This allele was firstly described in Grivette (Demars et al., 2013), and recently in Mouton Vendéen (Chantepie et al., 2018), Romanov, Dorper and Ovella Galega (Vera et al., 2018) sheep breeds.

### Frequency

- ✓ Very low frequency in Rasa aragonesa population
- ✓ Only one *FecX<sup>Gr</sup>* animal from Rasa aragonesa were detected in the biodiversity panel.

	Prolificacy	Frequency	
		<i>FecX<sup>Gr</sup></i> /Normal	<i>FecX<sup>Gr</sup></i> /Normal
Flock 1 (n=1524)	1.47	0.28	0.02
Flock 2 (n=779)	1.50	0.02	0.01
Flock 3 (n=765)	1.72	0.58	0.0015
Flock 4 (n=360)	1.38	0.02	0

### *FecX<sup>Gr</sup>* effect

Breed	Genotype effect	
	<i>FecX<sup>Gr</sup></i> /Normal	<i>FecX<sup>Gr</sup></i> / <i>FecX<sup>Gr</sup></i>
Grivette <sup>1</sup>	+ 0.10	+ 0.67
Mouton Vendéen <sup>2</sup>	+ 0.30	Few animals
Rasa aragonesa <sup>2</sup>	+ 0.41 (comparing with the mean prolificacy in each flock)	No animals

<sup>1</sup>Demars, J. et al. (2013); <sup>2</sup>Chantepie, L. et al. (2018). Recorded in both breeds without hormonal treatment; <sup>3</sup> 133 lambings from 29 ewes.

### Double heterozygous studies

- ✓ These mutations were located in different chromosomes.
- ✓ The two animals were prolific (prolificacy = + 0.35).

Acknowledgments: PIRINNOV IFA103/15 project is co-financed by FEDER within the POCTEFA framework. The authors wish to thank UPRA-Grupo Pastores, ARAMA, AGROBI, ARACCIO, ATURA, ARANA, ACCOAN, ACROCI and ANGORCA breeders associations for the experimental animals.

Manuscript Number:

Title: A new allele in the BMP15 gene (FecXRA) that affects prolificacy co-segregates with FecXR and FecXGR in Rasa aragonesa sheep.

Article Type: Original Research Article

Keywords: Prolificacy; Rasa aragonesa; sheep; BMP15; FecXRA; FecXR; FecXGR

Corresponding Author: Dr. Jorge H H Calvo, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: CITA

First Author: Jorge H H Calvo, Ph.D.

Order of Authors: Jorge H H Calvo, Ph.D.; Louise Chantepie; M<sup>a</sup> Magdalena Serrano, PhD; María P Sarto; Laura P Iguacel; María A Jiménez; José L Alabart; José Folch; Stéphane Fabre; Belén Lahoz

Abstract: A FecX-mutated allele called FecXR in the BMP15 gene has been described in Rasa aragonesa sheep. FecXR causes increased prolificacy when heterozygous and sterility when homozygous in ewes. However, highly prolific ewes without the FecXR allele have been found in this breed. Therefore, a genome-wide association study (GWAS) was performed in 158 ewes (tail H: N = 73, mean prolificacy  $\pm$  standard deviation =  $2.14 \pm 0.26$ ; tail L: N = 85, mean prolificacy =  $1.06 \pm 0.08$ ) with the Ovine HD SNP BeadChip. In this analysis, the FecXGR allele was found to have genome-wide significance associated with prolificacy, first described in the Grivette sheep breed. We also identified a novel polymorphism in exon 2 of BMP15 associated with prolificacy by Sanger sequencing. This new mutation, called FecXRA, is a SNP (Oar3.1\_X: g. 50970948C>T; NM\_001114767.1: c.1172C>T) that produces an amino acid substitution (ENSOART00000010201: p.T400I) that is predicted to be deleterious and to alter the predicted secondary structure of the mature protein. We found one hemizygous sire for the FecXRA allele with the highest EBV (Estimated Breeding Value) in the breeding program (+ 0.40). Finally, to validate these results and their implications for the FecXGR, FecXRA and FecXR alleles on prolificacy, we genotyped the three SNPs in 3,826 ewes. A very low frequency was found for the FecXGR and FecXRA alleles in the population studied. Only significant differences between FecXGR and FecXR were found among the three alleles associated with increased prolificacy. However, significant increased prolificacy of  $0.52 \pm 0.05$ ,  $0.42 \pm 0.05$  and  $0.32 \pm 0.01$  were found when comparing FecXGR, FecXRA and FecXR heterozygous ewes to wild type homozygous ones. However, we cannot confirm the effect of the FecXRA allele at homozygous state because we did not find any homozygous ewes. These results confirm that these three alleles in the BMP15 gene that affect prolificacy co-segregate in Rasa aragonesa sheep.

**\*Highlights (for review)**

**Highlights**

- A novel *FecX*-mutated allele (*FecX<sup>RA</sup>*) associated with prolificacy was found.
- The *FecX<sup>RA</sup>* allele leads a change of a Threonine to Isoleucine (T400I), predicted as deleterious.
- The already known *FecX<sup>GR</sup>* allele associated to prolificacy was also found.
- Three alleles in the *BMP15* gene that affect prolificacy co-segregate in Rasa aragonesa sheep.

1 **A new allele in the *BMP15* gene (*FecX<sup>RA</sup>*) that affects prolificacy co-**  
2 **segregates with *FecX<sup>R</sup>* and *FecX<sup>GR</sup>* in Rasa aragonesa sheep**

3

4 **Running title:** *Three FecX alleles co-segregating*

5

6 Jorge Hugo Calvo<sup>a,b,\*</sup>, Louise Chantepie<sup>c</sup>, Malena Serrano<sup>d</sup>, María Pilar Sarto<sup>a</sup>,  
7 Laura Pilar Iguacel<sup>a</sup>, M<sup>a</sup> Ángeles Jiménez<sup>d</sup>, José Luis Alabart<sup>a</sup>, José Folch<sup>a</sup>,  
8 Stéphane Fabre<sup>c</sup>, Belén Lahoz<sup>a</sup>.

9 <sup>a</sup>Unidad de Producción y Sanidad Animal, Centro de Investigación y Tecnología  
10 Agroalimentaria de Aragón (CITA)- Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2)  
11 (CITA-Universidad de Zaragoza), Zaragoza, Spain; <sup>b</sup>ARAID, Zaragoza, Spain;

12 <sup>c</sup>Université de Toulouse, INRA, ENVT, GenPhySE, Castanet-Tolosan, France;

13 <sup>d</sup>Departamento de Mejora Genética Animal, INIA, Madrid, Spain

14

15

16

17

18

19

20

21 \*Corresponding author: Tel. 34976716471. E-mail address: [jhcalvo@aragon.es](mailto:jhcalvo@aragon.es)  
22 (J.H.Calvo)

23

24 **Abstract**

25 A *FecX*-mutated allele called *FecX<sup>R</sup>* in the *BMP15* gene has been described in  
26 Rasa aragonesa sheep. *FecX<sup>R</sup>* causes increased prolificacy when  
27 heterozygous and sterility when homozygous in ewes. However, highly prolific  
28 ewes without the *FecX<sup>R</sup>* allele have been found in this breed. Therefore, a  
29 genome-wide association study (GWAS) was performed in 158 ewes (tail H: N  
30 = 73, mean prolificacy  $\pm$  standard deviation =  $2.14 \pm 0.26$ ; tail L: N = 85, mean  
31 prolificacy =  $1.06 \pm 0.08$ ) with the Ovine HD SNP BeadChip. In this analysis, the  
32 *FecX<sup>GR</sup>* allele was found to have genome-wide significance associated with  
33 prolificacy, first described in the Grivette sheep breed. We also identified a  
34 novel polymorphism in exon 2 of *BMP15* associated with prolificacy by Sanger  
35 sequencing. This new mutation, called *FecX<sup>RA</sup>*, is a SNP (Oar3.1\_X: g.  
36 50970948C>T; NM\_001114767.1: c.1172C>T) that produces an amino acid  
37 substitution (ENSOART00000010201: p.T400I) that is predicted to be  
38 deleterious and to alter the predicted secondary structure of the mature protein.  
39 We found one hemizygous sire for the *FecX<sup>RA</sup>* allele with the highest EBV  
40 (Estimated Breeding Value) in the breeding program (+ 0.40). Finally, to  
41 validate these results and their implications for the *FecX<sup>GR</sup>*, *FecX<sup>RA</sup>* and *FecX<sup>R</sup>*  
42 alleles on prolificacy, we genotyped the three SNPs in 3,826 ewes. A very low  
43 frequency was found for the *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>RA</sup>* alleles in the population  
44 studied. Only significant differences between *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>R</sup>* were found  
45 among the three alleles associated with increased prolificacy. However,  
46 significant increased prolificacy of  $0.52 \pm 0.05$ ,  $0.42 \pm 0.05$  and  $0.32 \pm 0.01$   
47 were found when comparing *FecX<sup>GR</sup>*, *FecX<sup>RA</sup>* and *FecX<sup>R</sup>* heterozygous ewes to  
48 wild type homozygous ones. However, we cannot confirm the effect of the



49 *FecX<sup>RA</sup>* allele at homozygous state because we did not find any homozygous  
50 ewes. These results confirm that these three alleles in the *BMP15* gene that  
51 affect prolificacy co-segregate in Rasa aragonesa sheep.

52

53 **Keywords:** Prolificacy, Rasa aragonesa, sheep, BMP15, *FecX<sup>RA</sup>*, *FecX<sup>R</sup>*,  
54 *FecX<sup>GR</sup>*

55

56

## 57 **1. Introduction**

58 Rasa aragonesa is an autochthonous Mediterranean sheep breed from  
59 northeastern Spain raised for meat purposes. Prolificacy is one of the most  
60 important factors for the economic profitability of meat flocks [1]. Efficiency  
61 improvements on farms are made possible by exploiting changes in genetics  
62 and environmental factors, such as the nutrition and management of the flock.

63 In this context, since 1994, the Cooperative Oviaragon-Grupo Pastores has  
64 carried out a selection program for prolificacy in this breed, with 490,337  
65 controlled ewes at present. A *FecX*-mutated allele called *FecX<sup>R</sup>* in the *BMP15*  
66 gene was previously described in Rasa aragonesa sheep [2]. This  
67 polymorphism causes increased prolificacy in heterozygous ewes and sterility in  
68 homozygous variant ewes.

69 The first causal mutation associated with increased prolificacy in sheep was  
70 *FecB<sup>B</sup>* in the *Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B (BMPR1B)* gene [3–5].  
71 After this discovery, many alleles associated with increased ovulation rates in  
72 ewes have been described in *BMP15* (known as *FecX*) [6], *Growth*

73 *Differentiation Factor 9 (GDF9, known as FecG)* [7], and, more recently,  $\beta$ -1,4-  
74 *N-Acetyl-Galactosaminyl Transferase 2 (B4GALNT2, known as FecL)* [8] genes.  
75 *BMP15* has the highest number of alleles associated with hyperprolificacy in  
76 different breeds: the Rommey (*FecX<sup>I</sup>*, *FecG<sup>H</sup>*) [6], Belclare and Cambridge  
77 (*FecX<sup>G</sup>*, *FecX<sup>B</sup>*) [7], Lacaune (*FecX<sup>L</sup>*) [9], Rasa aragonesa (*FecX<sup>R</sup>*) [2], Grivette  
78 and Olkuska (*FecX<sup>GR</sup>*, *FecX<sup>O</sup>*) [10], and Tunisian Barbarine (*FecX<sup>BAR</sup>*) [11]  
79 breeds. These alleles are associated with increased prolificacy when  
80 heterozygous and sterility when homozygous, except for homozygous *FecX<sup>GR</sup>*  
81 and *FecX<sup>O</sup>* animals, which are not sterile but are instead hyper-prolific.  
82 In the selection program for prolificacy in Rasa aragonesa sheep, highly prolific  
83 ewes without the *FecX<sup>R</sup>* allele were found in the population. We hypothesized  
84 that other hyper-prolific genetic variants could co-segregate in this breed. Thus,  
85 the objectives of this study were to perform a genome-wide association study  
86 (GWAS) and sequence the *BMP15* gene in hyper-prolific animals to identify  
87 other hyper-prolific genetic variants in Rasa aragonesa sheep.

88

## 89 **2. Materials and methods**

### 90 *2.1 Animals*

#### 91 2.1.1 GWAS

92 Two groups of ewes with extreme values for prolificacy EBVs were chosen for a  
93 GWAS from a total of 15,047 live ewes from the selection nucleus of the  
94 Cooperative Oviaragon-Grupo Pastores breeding scheme, each with at least  
95 three lambings records and without the *FecX<sup>R</sup>* allele. The ewes selected for  
96 these groups were in the highest (H) 2.52% and lowest (L) 4.23% tails of EBV  
97 distribution of the nucleus. Finally, the samples included 158 ewes with EBVs

98 equal to or higher than +0.16 (compared to the current breed average EBVs)  
99 (tail H: N = 73, mean prolificacy  $\pm$  standard deviation =  $2.14 \pm 0.26$ ) and with  
100 EBVs equal to or lower than -0.11 (tail L: N = 85, mean prolificacy =  $1.06 \pm$   
101 0.08). The samples were selected as unrelated based on pedigree records.  
102 These ewes came from 33 and 36 different farms for high prolific and low  
103 prolific ewes, respectively.

104

105 2.1.2 Samples used to study the frequency and effects of the  
106 encountered mutations and validate the results.

107 Almost the total population of one flock (n=1,524) and 1,904 replacement ewe  
108 lambs from years 2017 and 2018 belonging to 3 flocks from the selection  
109 nucleus were selected for genotyping. Furthermore, a group of 325 ewes with  
110 high prolificacy records from another 20 different farms were also genotyped  
111 (mean prolificacy =  $2.22 \pm 0.25$ ). This panel included the tail H (N = 73). All of  
112 these animals had had at least one lambing. All sires (n = 91) with EBVs and  
113 without the *FecX<sup>R</sup>* allele were also genotyped.

114

## 115 2.2 Genotyping

### 116 2.2.1 GWAS

117 Genomic DNA was extracted from blood samples using the SpeedTools DNA  
118 Extraction Kit (Biotools, Madrid, Spain). Genotyping of 158 ewes was performed  
119 with the Ovine HD SNP BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA) designed by  
120 the International Sheep Genome Consortium [12]. SNP genotyping services  
121 were provided by the Spanish "Xenetica Fontao" company  
122 ([www.xeneticafontao.com](http://www.xeneticafontao.com)).

123

124           2.2.2 Frequency studies, and validation and quantification of the alleles  
125 associated with prolificacy

126 Genomic DNA was extracted as described above. The *FecX<sup>R</sup>* allele was  
127 genotyped as described by Martinez-Royo et al. [13] A genotyping test using  
128 fluorescent Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) was established for the  
129 detection of the *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>RA</sup>* alleles. Sequences flanking SNPs for both  
130 alleles in Rasa aragonesa sheep were used to design primers for genotyping by  
131 the platform provider (LGC Genomics, UK). KASP reactions were performed  
132 following the manufacturer's protocol. For all samples, KASP assays were  
133 carried out in a 10 µl volume containing 20 ng of genomic DNA, 5 µl of KASP  
134 V4.0 2x Master mix standard ROX (LGC Genomics, Beverly, MA, USA) and  
135 0.14 µl of KASP-by-Design assay mix (LGC Genomics, Beverly, MA, USA).  
136 Reactions were carried out in a CFX96 BioRad thermocycler (BioRad, Madrid,  
137 Spain) using the following conditions for both pairs of primers: 15 min at 94°C,  
138 followed by 10 cycles of 94°C for 20 s and 61°C for 1 min (dropping -0.6°C per  
139 cycle to achieve a 55°C final annealing temperature) and 25 cycles of 94°C for  
140 20 s and 55°C for 1 min. Following PCR, fluorescence was detected using a  
141 single quantification cycle of 37 °C for 1 s after cooling at 37 °C for 1 min.

142

### 143 2.3 DNA sequencing

144 Sanger sequencing was carried out to search for other polymorphisms in exon 2  
145 of *BMP15* that affected prolificacy. PCR was performed in a final PCR volume  
146 of 25 µl containing 50 ng of genomic DNA, 7 pmol of each primer (5'-  
147 CATCTCAAGGCTGCTTGTC A-3' and 5'-TTCGAATTTCTTGGGCAAAC-3',

148 which amplified a fragment of 1008 bp), 200 nM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM  
149 KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 and 1 U Taq polymerase (Biotools,  
150 Madrid, Spain). The cycling conditions were as follows: an initial denaturation  
151 step of 94°C for 3 min followed by 35 cycles of [94°C for 45 s, 53°C for 45 s,  
152 and 72°C for 45 s] and a final extension step of 72°C for 10 min. All PCR  
153 amplifications of genomic DNA were performed in a MyCycler thermal cycler  
154 (BioRad, Madrid, Spain). The PCR products were purified using the FlavorPrep  
155 Gel/PCR purification mini kit (Flavorgen, Ibian, Zaragoza, Spain) according to  
156 the manufacturer's instructions. The PCR products were sequenced in both  
157 directions by STAB Vida Lda. (Caparica, Portugal) using an ABI 3730XL  
158 sequencer (Applied Biosystems, CA, USA).

159 Homology searches were performed using BLAST (National Centre for  
160 Biotechnology Information: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). To align the  
161 sequences, the CLUSTAL Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)  
162 software was used. The Variant Effect Predictor software (VEP:  
163 [http://www.ensembl.org/Ovis\\_aries/Tools/VEP?db=core](http://www.ensembl.org/Ovis_aries/Tools/VEP?db=core)) and PolyPhen-2  
164 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) [14], which predicts the possible impact  
165 of an amino acid substitution on the structure and function of a protein, were  
166 used. The secondary structure of the protein was determined from the amino  
167 acid sequence using CFSSP software (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>) [15].

169

170 *2.4 Cloning for studying double heterozygous animals*

171 DNA from three double heterozygous animals (two for  $FecX^{GR}/FecX^R$  and one  
172  $FecX^{RA}/FecX^R$ ) was amplified using the primers and conditions described in the  
173 DNA sequencing section. The PCR products were cloned into the pGEM<sup>®</sup>-T  
174 basic vector (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's  
175 protocol. The ligated construct was transformed into JM109 High Efficient  
176 Competent cells (Promega, Madison, USA). Transformed colonies were  
177 selected based on boiling PCR. Briefly, colonies were boiled for 15 minutes in  
178 50  $\mu$ l of sterile water. Five microlitres of the boiled bacteria after centrifugation  
179 at 15,000 g for five minutes was used as a template for PCR. PCR for the three  
180 alleles was carried out as described in the genotyping section. Finally, positive  
181 selected colonies were transferred to LB culture medium with ampicillin for a  
182 miniprep culture overnight. Plasmid DNA was extracted using a GenElute  
183 Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Merck, Madrid, Spain). The sequences of all the  
184 plasmids were verified by Sanger sequencing using the SP6 and T7 primers by  
185 STAB Vida Lda. (Caparica, Portugal).

186

## 187 2.5 Statistical analysis

### 188 2.5.1 GWAS

189 We applied the quality control (QC) criteria to the raw genotypes as follows: i)  
190 Individuals with low call rates (<0.97) were excluded from additional analysis; ii)  
191 SNPs were also excluded if they had a low call rate (<0.97), a minor allele  
192 frequency (MAF) <0.01, or significant deviations from Hardy-Weinberg  
193 equilibrium (HWE) (P-value < 0.00001). QC was performed using PLINK 1.9  
194 [16]. The GWAS was performed for prolificacy data with the GCTA software  
195 (Yang et al., 2011) using a mixed linear model association (MLMA) and

196 including a genetic relationship matrix (GRM) to control for the random effects  
197 of genetic similarity. The Bonferroni correction was applied to adjust for the  
198 detection of multiple SNP loci. We established that a SNP was genome-wise  
199 significant when the raw P-value was lower than or equal to  $0.05/N$ , where N is  
200 the number of SNP loci tested in this study. Chromosome-wise significance  
201 level refers to the raw P-value  $0.05/n$ , where n is the number of SNP loci on  
202 each chromosome tested in this study. Visualization of the association data in  
203 Manhattan plots and quantile-quantile plots was performed using SNPEVG  
204 software [17].

205

#### 206 2.5.2 Gene association analysis

207 The effects of the genotype on prolificacy were analysed using a linear mixed  
208 model fit by maximum likelihood using the lme4 package for R. The  
209 Satterthwaite's method was used for the t-test. A P-value lower than 0.05 was  
210 considered statistically significant. Because of the low number of  $FecX^{GR}$  and  
211  $FecX^{RA}$  heterozygous ewes, we restricted the analysis to the farms and years of  
212 lambing in which  $FecX^{GR}$  and  $FecX^{RA}$  ewes had lambings. The effects of the  
213 farm (16 levels), genotype (4 levels: + (wild type)/+,  $+/FecX^{GR}$ ,  $+/FecX^{RA}$ , and  
214  $+/FecX^R$ ), year of lambing (23 levels), month of lambing (12 levels), number of  
215 lambings (12 levels), reproduction management (7 levels: natural mated ewes,  
216 natural mated ewes following FGA sponge and eCG, melatonin treatment,  
217 artificially inseminated (AI) ewes following FGA sponge and eCG treatment,  
218 natural mated ewes returning to estrus after previous mating or AI using FGA  
219 sponge and eCG treatment, and unknown), interval between lambings (6 levels:  
220 first lambing, less than 90 days, between 90 and 160 days, more than 160 days,

221 and two levels that included mistakes because of very long or short intervals  
222 recorded between lambings) were considered fixed effects, and the animal was  
223 considered to be a random effect. To test differences between genotypes, the  
224 least square means (LSMs  $\pm$  standard error) for each pair-wise comparison  
225 were estimated. The *FecX<sup>R</sup>* genotypes in these farms and years are based on  
226 genotyping records from 2007. Before 2007, daughters of *FecX<sup>R</sup>* rams were  
227 considered to be heterozygous *FecX<sup>R</sup>* ewes. In total, 63,865 ewes with 378,042  
228 lambing records were included in the analysis: 37 (231 lambing records), 46  
229 (241) and 5,250 (24,398) ewes for *FecX<sup>GR</sup>*, *FecX<sup>RA</sup>* and *FecX<sup>R</sup>* alleles,  
230 respectively.

231

### 232 **3. Results and Discussion**

233 The GWAS was performed after QC of the raw genotype. A total of 570,635  
234 SNPs distributed on the 27 ovine chromosomes were included in subsequent  
235 analyses. Figure 1 shows Manhattan plots across the whole genome for the  
236 prolificacy traits, with SNP associations represented as  $\log_{10}(1/P\text{-value})$  on the  
237 y-axis. The genome-wise significance threshold adjusted for multiple testing  
238 was established at  $8.76 \times 10^{-8}$ . The SNP *oar3\_OAR27\_50971170\_dup* was  
239 significant at the genome-wise threshold. This SNP (*Oar3.1\_X*: g. 50971170  
240 C>T) is located in the *BMP15* gene and is known as the *FecX<sup>GR</sup>* allele [10]. We  
241 only found 13 heterozygous ewes with a mean prolificacy of  $2.41 \pm 0.19$ , all  
242 from the tail H.

243 Exon 2 of the *BMP15* gene was sequenced in these ewes to confirm the results.  
244 We only found a non-conservative mutation of the *FecX<sup>GR</sup>* allele  
245 (NM\_001114767.1: c.950C>T; *Oar3.1\_X*: g. 50971083 C>T;



246 ENSOART00000010201: p.T317I). No homozygous animals were found to  
247 have this allele, but the *FecX<sup>GR</sup>* allele does not induce sterility when  
248 homozygous in other breeds [10]. This allele was first described in Grivette  
249 sheep [10] and, more recently, in Mouton Vendéen [18], Romanov, Dorper and  
250 Ovella Galega [19] sheep breeds.

251 We decided to sequence exon 2 of *BMP15* in the remaining 158 ewes to search  
252 for other possible polymorphisms associated with prolificacy. We found a new  
253 mutation in 9 animals, also located in the region that encoded the mature  
254 *BMP15* protein (Oar3.1\_X: g.50970948C>T; ENSOART00000010201: p.T400I;  
255 NM\_001114767.1: c.1172C>T). This mutation had not been previously  
256 described and was predicted to be deleterious and probably damaging by VEP  
257 (with a SIFT value of 0.00) and PolyPhen-2 (with a score of 1.00), respectively.  
258 Threonine is a slightly polar amino acid, whereas isoleucine is an aliphatic,  
259 branched hydrophobic amino acid, and this change clearly affects the  
260 hydrophobicity of the protein. This mutation also alters the predicted secondary  
261 structure of the mature protein, losing a turn and increasing the length of a  $\beta$ -  
262 pleated sheet by one amino acid (Supplementary Figure 1).

263 Nine ewes from the H tail were heterozygous for this SNP, with a mean  
264 prolificacy of  $2.11 \pm 0.25$ . No homozygous animals were found among the 158  
265 animals. We included this SNP in the GWAS dataset and performed a new  
266 analysis. No genome or chromosome-wise significance was found except for  
267 the *FecX<sup>GR</sup>* allele possibly because the GWAS did not have enough power to  
268 detect an effect on prolificacy considering that we only found 9 heterozygous  
269 ewes.

270 To confirm the effect of this SNP on prolificacy, we genotyped sires with EBVs  
271 from the Cooperative Oviaragon-Grupo Pastores breeding scheme for the SNP  
272 c.1172C>T and the *FecX<sup>GR</sup>* allele. We only found one deceased hemizygous  
273 ram for SNP c.1172C>T with 206 daughters at 47 different farms, with a mean  
274 prolificacy of 1.62 (accounting 1347 lambings). All the daughters had medium–  
275 high EBVs, between +0.10 and +0.35. The EBV for this sire was +0.39, the  
276 highest EBV in the breeding program. These data together with the low mean  
277 prolificacy of this breed (1.35) suggest an effect of this SNP on the prolificacy  
278 trait. This new allele of the *BMP15/FecX* gene in the Rasa aragonesa  
279 population was named *FecX<sup>RA</sup>*.

280 To validate these results and the implications of the *FecX<sup>RA</sup>* allele on prolificacy,  
281 we genotyped for the presence of *FecX<sup>GR</sup>*, *FecX<sup>RA</sup>* and *FecX<sup>R</sup>* alleles in 3826  
282 ewes. Very low frequencies were found for the *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>RA</sup>* alleles in  
283 the population studied, ranging from 0.13 to 2% (Supplementary Table 1). In the  
284 farm with a 2% frequency of the *FecX<sup>RA</sup>* allele, a hemizygous ram for this allele  
285 was found. However, we found a higher percentage of these variants in the  
286 group of 325 ewes with high prolificacy records: 23 *FecX<sup>GR</sup>* and 23 *FecX<sup>RA</sup>* (7%  
287 for each allele). We did not find homozygous animals with these variants, but  
288 we found three double heterozygous ewes (two for *FecX<sup>GR</sup>/FecX<sup>R</sup>* and one  
289 *FecX<sup>RA</sup>/FecX<sup>R</sup>*). We verified by cloning that the two alleles were on different  
290 chromosomes. Although homozygous animals with *FecX<sup>R</sup>* are sterile [13],  
291 homozygous *FecX<sup>GR</sup>* are hyper-prolific [10]. The two *FecX<sup>GR</sup>/FecX<sup>R</sup>* animals  
292 were not sterile and had, in total, 9 lambings, with a mean prolificacy of  $2.33 \pm$   
293  $0.16$ , a similar prolificacy to heterozygous *FecX<sup>GR</sup>* animals found in the tail H  
294 ( $2.41 \pm 0.19$ ). The double heterozygous ewe for *FecX<sup>RA</sup>/FecX<sup>R</sup>* is 2.5 years old,

295 and it has not had any lambings to date. This ewe could be infertile, and thus,  
296 the homozygous *FecX<sup>RA</sup>* allele may produce sterility. However, we cannot  
297 confirm this because we did not find any homozygous ewes for this allele.

298 To validate and quantify the effects of the *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>RA</sup>* alleles, an  
299 association study was performed. In total, we recorded 231 and 241 lambings  
300 from 37 and 46 ewes for the *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>RA</sup>* alleles, respectively. The  
301 *FecX<sup>RA</sup>* ewes were not the daughters of the hemizygous ram. Significant  
302 differences ( $p < 0.001$ ) were found in the genotype effects between *FecX<sup>+</sup>/FecX<sup>+</sup>*  
303 ewes and those with one copy of the *FecX<sup>GR</sup>*, *FecX<sup>RA</sup>* or *FecX<sup>R</sup>* alleles (Table  
304 1). Prolificacy was increased by  $0.52 \pm 0.05$ ,  $0.42 \pm 0.05$ , and  $0.32 \pm 0.01$  when  
305 comparing the *FecX<sup>GR</sup>*, *FecX<sup>RA</sup>* or *FecX<sup>R</sup>* ewes to wild type ewes, respectively.  
306 With respect to *FecX<sup>RA</sup>*, no significant differences were found from the *FecX<sup>GR</sup>*  
307 or *FecX<sup>R</sup>* alleles after Bonferroni correction. These results confirm the effect of  
308 the new allele of *BMP15/FecX* on prolificacy. However, we have to consider that  
309 only a low number of *FecX<sup>RA</sup>* ewes have been identified to date.

310 With respect to the other alleles, the *FecX<sup>R</sup>* results show a similar prolificacy to  
311 those described previously considering all of the databases [20,21]. The effect  
312 of the *FecX<sup>R</sup>* allele seems to be the lowest of the three known prolific alleles in  
313 Rasa aragonesa sheep. Nevertheless, this requires confirmation with a higher  
314 number of ewes, as the difference between the *FecX<sup>RA</sup>* and *FecX<sup>R</sup>* alleles has  
315 not reached statistical significance after Bonferroni correction. It is important  
316 that *FecX<sup>GR</sup>* showed an increase of prolificacy of  $0.20 \pm 0.05$  ( $p < 0.001$ ) with  
317 respect to the *FecX<sup>R</sup>* ewes. The effect of the *FecX<sup>GR</sup>* allele is the greatest in  
318 Rasa aragonesa sheep ( $+0.52$ ) and greater than in other breeds, which showed  
319 an increased litter size of  $+0.10$  and  $+0.30$  in Grivette [10] and Mouton Vendéen

320 [18], respectively, at heterozygous state. However, homozygous *FecX<sup>GR</sup>* ewes  
321 in Grivette showed an increasing prolificacy of 0.65 compared to non-carrier  
322 ewes. The different allelic effects on litter size observed in Rasa aragonesa in  
323 comparison with Grivette and Mouton Vendéen breeds could be due to the  
324 lower litter size of wild type Rasa Aragonesa (1.35) when compared to wild type  
325 in Grivette (1.83) [10] or Mouton Vendéen (1.55) [18] ewes. As the *FecL<sup>L</sup>*  
326 mutation, which is known to segregate in Lacaune, Noire du Velay and D'man  
327 [22] breeds, the *FecX<sup>GR</sup>* allele is shared between 5 different populations in  
328 France, Belgium and Spain. The question of the origin of the mutations shared  
329 by several populations is paused.

330 The only significant difference in the effect on prolificacy were found between  
331 the *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>R</sup>* alleles ( $0.20 \pm 0.05$ ). The *FecX<sup>R</sup>* allele is a deletion of 17  
332 nucleotides at the beginning of exon 2, before the coding region of the mature  
333 protein, that introduces a premature stop codon and produces a non-functional  
334 peptide [2]. However, the *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>RA</sup>* mutations involve the substitution  
335 of a threonine to an isoleucine at positions 49 and 123 of the mature protein,  
336 respectively (the active mature peptide is 125 amino acids long; Galloway et al.,  
337 2000). However, we were unable to find homozygous *FecX<sup>RA</sup>* ewes to confirm a  
338 hyper-prolific or sterile phenotype similar to that found in homozygous *FecX<sup>GR</sup>*  
339 or *FecX<sup>R</sup>* ewes, respectively

340

#### 341 **4. Conclusions**

342 In conclusion, along with *FecX<sup>R</sup>*, two other mutations impacting the BMP15  
343 coding sequence, the already known *FecX<sup>GR</sup>* (T317I) and the new *FecX<sup>RA</sup>*

344 (T400I), are associated with increased prolificacy in Rasa aragonesa sheep.  
345 Different effects are found for the three mutations segregating in this breed. The  
346 selection program for prolificacy should implement the genotyping of  
347 reproducers for the three alleles to determine their frequencies and the size of  
348 their effects and also to search for homozygous animals. All this information will  
349 help to make management decisions for the Rasa aragonesa population,  
350 knowing that management of 3 different mutations affecting the same trait is  
351 very challenging.

352 .

353

#### 354 **Acknowledgments**

355 This study was supported by the PIRINNOVI EFA103/15 project co-financed by  
356 FEDER within the POCTEFA framework, and the Research Group Funds of  
357 Aragón Government (A14\_17R). The authors wish to thank UPRA-Grupo  
358 Pastores, the breeders' association, for the experimental samples.

359

#### 360 **References**

- 361 [1] Pardos L, Maza Rubio MT, Fantova E. The diversity of sheep production  
362 systems in Aragón (Spain): characterisation and typification of meat  
363 sheep farms. Spanish J Agric Res 2008;6:497. doi:10.5424/sjar/2008064-  
364 344.
- 365 [2] Martínez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Martí JI, Alabart JL, Roche A,  
366 et al. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes  
367 sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. Anim Genet

- 368 2008;39:294–7. doi:10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x.
- 369 [3] Souza C, MacDougall C, MacDougall C, Campbell B, McNeilly A, Baird D.  
370 The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone  
371 morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J Endocrinol*  
372 2001;169:R1–6. doi:10.1677/joe.0.169r001.
- 373 [4] Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, et al.  
374 Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with  
375 increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci*  
376 2001;98:5104–9. doi:10.1073/pnas.091577598.
- 377 [5] Wilson T, Wu X-Y, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, et al.  
378 Highly Prolific Booroola Sheep Have a Mutation in the Intracellular Kinase  
379 Domain of Bone Morphogenetic Protein IB Receptor (ALK-6) That Is  
380 Expressed in Both Oocytes and Granulosa Cells<sup>1</sup>. *Biol Reprod*  
381 2001;64:1225–35. doi:10.1095/biolreprod64.4.1225.
- 382 [6] Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL,  
383 Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene  
384 (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-  
385 sensitive manner. *Nat Genet* 2000;25:279–83. doi:10.1038/77033.
- 386 [7] Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et  
387 al. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and  
388 BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility  
389 in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*)<sup>1</sup>. *Biol Reprod*  
390 2004;70:900–9. doi:10.1095/biolreprod.103.023093.
- 391 [8] Drouilhet L, Mansanet C, Sarry J, Tabet K, Bardou P, Woloszyn F, et al.

- 392 The Highly Prolific Phenotype of Lacaune Sheep Is Associated with an  
393 Ectopic Expression of the B4GALNT2 Gene within the Ovary. *PLoS*  
394 *Genet* 2013;9:e1003809. doi:10.1371/journal.pgen.1003809.
- 395 [9] Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, et al.  
396 A Novel Mutation in the Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Causing  
397 Defective Protein Secretion Is Associated with Both Increased Ovulation  
398 Rate and Sterility in Lacaune Sheep. *Endocrinology* 2007;148:393–400.  
399 doi:10.1210/en.2006-0764.
- 400 [10] Demars J, Fabre S, Sarry J, Rossetti R, Gilbert H, Persani L, et al.  
401 Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations  
402 responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS*  
403 *Genet* 2013;9:e1003482. doi:10.1371/journal.pgen.1003482.
- 404 [11] Lassoued N, Benkhilil Z, Woloszyn F, Rejeb A, Aouina M, Rekik M, et al.  
405 *FecX Bar* a Novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female  
406 sterility in Tunisian Barbarine Sheep. *BMC Genet* 2017;18:43.  
407 doi:10.1186/s12863-017-0510-x.
- 408 [12] Kijas JW, Porto-Neto L, Dominik S, Reverter A, Bunch R, McCulloch R, et  
409 al. Linkage disequilibrium over short physical distances measured in  
410 sheep using a high-density SNP chip. *Anim Genet* 2014;45:754–7.  
411 doi:10.1111/age.12197.
- 412 [13] Martinez-Royo A, Dervishi E, Alabart JL, Jurado JJ, Folch J, Calvo JH.  
413 Freemartinism and *FecXR* allele determination in replacement ewes of  
414 the Rasa Aragonesa sheep breed by duplex PCR. *Theriogenology*  
415 2009;72:1148–52. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.06.029.

- 416 [14] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork  
417 P, et al. A method and server for predicting damaging missense  
418 mutations. *Nat Methods* 2010;7:248–9. doi:10.1038/nmeth0410-248.
- 419 [15] Ashok Kumar T (2013). CC and FSSP server. *WSRJ* 1(9):15-19. CFSSP:  
420 Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server. *WIDE Spectr*  
421 2013;1:15–9.
- 422 [16] Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-  
423 generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets.  
424 *Gigascience* 2015;4:7. doi:10.1186/s13742-015-0047-8.
- 425 [17] Wang S, Dvorkin D, Da Y. SNPEVG: a graphical tool for GWAS graphing  
426 with mouse clicks. *BMC Bioinformatics* 2012;13:319. doi:10.1186/1471-  
427 2105-13-319.
- 428 [18] Chantepie L, Bodin L, Sarry J, Woloszyn F, Ruesche J, Drouilhet L, et al.  
429 Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du  
430 Velay and Mouton Vendéen sheep breeds. *Livest Sci* 2018;216:44–50.  
431 doi:10.1016/J.LIVSCI.2018.07.007.
- 432 [19] Vera M, Aguion M, Bouza C. Detection of Grivette BMP15 prolificacy  
433 variant (FecXGR) in different sheep breeds presented in Galicia (NW  
434 Spain). *Gene Reports* 2018;12:109–14.  
435 doi:10.1016/J.GENREP.2018.06.008.
- 436 [20] Fathallah S, Alabart JL, Bodin L, Jiménez-Hernando MA, Lahoz B,  
437 Fantova E, et al. Relaciones entre los efectos del gen BMP15 y los  
438 efectos poligénicos sobre la prolificidad en la raza ovina Rasa Aragonesa  
439 2016;112:45–56. doi:10.12706/itea.2016.003.



440 [21] Jurado JJ, Martínez-Royo A, Calvo JH. Efecto fenotípico del alelo  
441 BMP15/FecxR en la prolificidad de la población de CarnesOviaragon  
442 S.C.L. ITEA Inf Tec Econ Agrar 2008;104:149–54.

443 [22] Ben Jemaa S, Ruesche J, Sarry J, Woloszyn F, Lassoued N, Fabre S.  
444 The high prolificacy of D'man sheep is associated with the segregation of  
445 the FecL L mutation in the B4GALNT2 gene. *Reprod Domest Anim*  
446 2019;54:531–7. doi:10.1111/rda.13391.

447 **Figure captions**

448

449 **Fig. 1.** Manhattan plots of the genome-wide association study with the  
450 prolificacy trait. Chromosomes 1–26, and X (27) are shown separated by colour.  
451 Values above  $\log_{10}(1/p)$  (observed value)  $>7.06$  (green horizontal) are of  
452 genome-wise significance.

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462

463

464

465

466

467

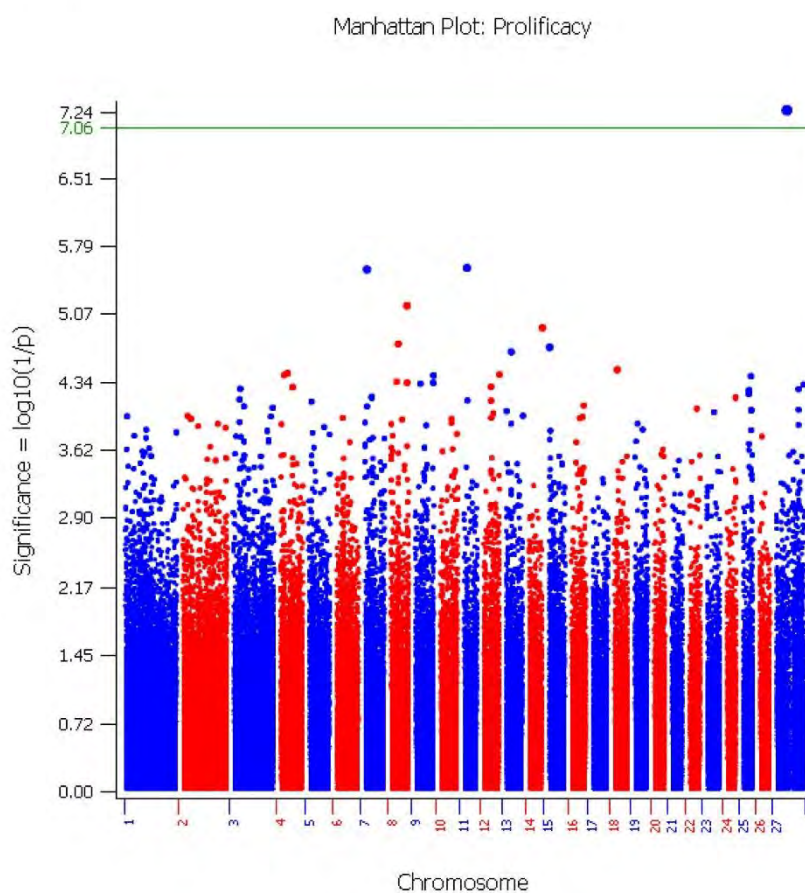
**Table 1**

**Table 1.** Effect of the *BMP15* genotypes on the prolificacy of Rasa aragonesa sheep. Means with a different letters indicate significant differences at  $P < 0.001$  according to Bonferroni correction.

P-value genotype	<i>BMP15</i> genotype			
	Wild type	<i>FecX<sup>GR</sup></i>	<i>FecX<sup>RA</sup></i>	<i>FecX<sup>R</sup></i>
<0.001	1.49 ± 0.01a	2.01 ± 0.05b	1.91 ± 0.03b,c	1.81 ± 0.01c

**Fig. 1**

**Fig. 1.**



Supplementary Table 1

**Supplementary Table 1.** Mean prolificacy of the flock and the *FecX<sup>RA</sup>*, *FecX<sup>GR</sup>* and *FecX<sup>R</sup>* alleles frequencies in almost the total population of one flock (Flock 1), and 1904 replacement ewe lambs from three flocks (Flocks 2–4).

	Prolificacy	Frequency		
		<i>FecX<sup>Gr</sup></i>	<i>FecX<sup>RA</sup></i>	<i>FecX<sup>R</sup></i>
Flock 1 (n=1,524)	1.47	0.005	0.003	0.28
Flock 2 (n=779)	1.5	0.008	0.02	0.02
Flock 3 (n=765)	1.72	0.0013	0.0013	0.58
Flock 4 (n=360)	1.38	0	0	0.02

Supplementary Fig.1

**Supplementary Fig. 1.** Predicted secondary structure of the mature BMP15 protein using CFSSP software. A) Wild type allele; B) *FecX<sup>RA</sup>* allele.

A)



B)





Dans le cadre du projet PIRINNOVI ciblant les races ovines pyrénéennes, j'ai eu accès à un panel de 288 échantillons d'ADN provenant des races espagnoles Rasa aragonesa, Navarra, Xisqueta, Ansotana, Ojinegra, Cartera, Maellana, Churra Tensina et Roya bilbilitana. Hormis pour une brebis hétérozygote Rasa Aragonesa, la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* n'a pas été retrouvée dans les autres races espagnoles testées. Au cours de cette étude par une approche génome complet, c'est finalement une mutation déjà connue qui a été identifiée. L'identification a été immédiate puisque le SNP causal *FecX<sup>Gr</sup>* était présent sur la puce de génotypage 680k démontrant l'utilité de la mise à jour de ces outils génomiques avec les mutations découvertes ayant un effet majeur sur les phénotypes d'intérêt pour la sélection. Cependant, l'hypothèse de départ de la ségrégation d'une seconde mutation dans la race Rasa Aragonesa qui reposait sur la descendante d'un mâle à fort index de prolificité, finalement non porteur de *FecX<sup>Gr</sup>*, laisse maintenant présager d'une troisième mutation en ségrégation contrôlant ce caractère.

- 4) Article III – A new allele in the *BMP15* gene (*FecX<sup>RA</sup>*) that affects prolificacy co-segregate with *FecX<sup>R</sup>* and *FecX<sup>Gr</sup>* in Rasa Aragonsa sheep.



### III. Discussion – Partie 1

L'objectif de cette première partie des résultats correspondant aux objectifs du projet PROLIGEN (APIS-GENE) était d'identifier de nouvelles populations ovines françaises dans lesquelles pouvait ségréger une mutation à effet majeur sur la prolificité et d'identifier ces mutations. Par des approches statistiques sur la relation moyenne/variance de la prolificité, des observations empiriques des performances sur la taille de portée et les éléments de la littérature, couplées aux approches de génétiques moléculaires s'appuyant sur les mutations candidates déjà identifiées ou les outils de la génomique à haut-débit, j'ai pu caractériser au cours de ce travail de thèse 7 populations françaises différentes (Noire du Velay, Mouton Vendéen, Blanche du Massif Centrale, Lacaune, Belle-Île, Ile de France et Martinik Black Belly) et deux populations européennes (Rasa Aragonesa et Flemish) dans lesquelles ségrége au moins une des trois mutations déjà identifiées dans d'autres populations (*FecL<sup>L</sup>* dans *B4GALNT2*, *FecX<sup>Gr</sup>* dans *BMP15* et *FecG<sup>E</sup>* dans *GDF9*) ou une des deux mutations nouvellement identifiées par ce travail, *FecX<sup>N</sup>* et *FecX<sup>f</sup>* dans *BMP15*. Seul le polymorphisme *FecX<sup>C</sup>* dans *BMP15* découvert dans la population Causse du Lot ne semble pas être causal d'une augmentation de prolificité de cette race.

#### A. Origine des mutations de prolificité partagées dans plusieurs populations

L'aboutissement de ce travail de découverte, m'a permis de montrer qu'une même mutation de prolificité pouvait ségréger dans différentes populations ovines en France et même plus largement au niveau mondial. En effet, j'ai pu montrer que la mutation *FecL<sup>L</sup>* originellement découverte en race Lacaune ségrége également dans la population Noire du Velay (Article 1 ; Chantepie et al., 2018) et les travaux de l'équipe ont pu l'identifier aussi dans la race Nord-Africaine D'Man (Ben Jemaa et al., 2018). De la même façon, la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* identifiée en Race Grivette, est retrouvée dans les populations Mouton Vendéen (Article I page 55; Chantepie et al., 2018), Flemish (Poster 1 en annexe ; Meyermans et al., 2018), Rasa Aragonesa (Poster page 87 ; Chantepie, 2019), mais elle vient aussi d'être identifiée dans les races Romanov, Dorper et Ovella Galega (Vera et al., 2018). J'ai également identifié la mutation *FecG<sup>E</sup>* découverte en race Santa Inès au Brésil, dans la population Martinik Black Belly originaire des Antilles. Enfin, la nouvelle mutation *FecX<sup>N</sup>* que j'ai découverte en Noire du Velay, se trouve également dans les populations Blanche du Massif Central, Lacaune et Belle-Île (Article 2, Chantepie et al., soumis).

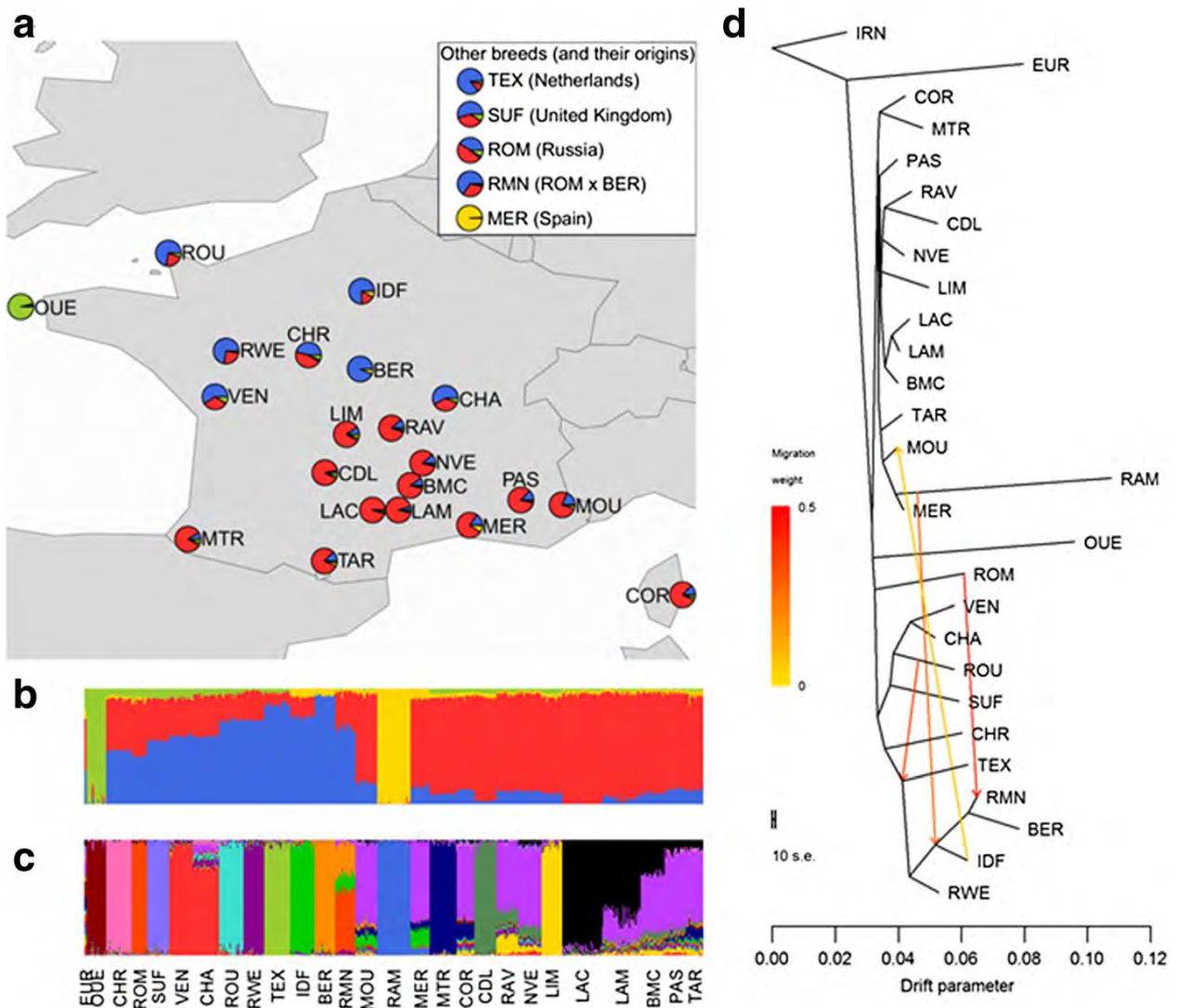


Figure 63: Structure des populations de mouton français.

(Rochus et al. 2018) (a) Coefficients d'ascendance individuels moyens au sein de la race pour quatre populations ancestrales. Les races sont cartographiées en fonction de leur origine géographique. Coefficients d'ascendance individuels pour (b) quatre populations ancestrales et (c) 16 populations ancestrales. d) Arbre de population à probabilité maximale avec quatre événements migratoires.



Toutes ces observations confirment celles déjà rapportées pour d'autres mutations et d'autres races et posent la question de l'origine et de la diffusion de ces mutations entre populations. Ainsi, la mutation Booroola, *FecB<sup>B</sup>*, identifiée en Mérinos australien, mais retrouvée également dans les populations Garole (Inde), Javanese (Indonésie), Hu et Han (Chine), aurait son origine dans la race Garole, où elle est fixée, et aurait été diffusée par croisement avec les autres races à partir du 18<sup>ème</sup> siècle (Davis et al., 1982, 2001, 2006). Par ailleurs, les mutations *FecX<sup>G</sup>* et *FecG<sup>H</sup>* présentent dans les races composites Belclare et Cambridge créées dans les années 60, auraient leur origine dans la race galloise Lleyn (Mullen et al., 2013). S'il est encore difficile de faire le lien entre les races D'Man et Lacaune pour la mutation *FecL<sup>L</sup>*, ou Belle Ile et Noire du Velay pour la mutation *FecX<sup>N</sup>*, certaines données de diversité génétique aident à mieux comprendre que les races de massifs localisées dans le centre de la France comme la Lacaune, la Noire du Velay et la Blanche du Massif Central puissent partager les mêmes mutations. En effet, la Figure 63 représente la structure phylogénétique des races domestiques de mouton en France en deux groupes principaux, ceux d'origine de la voie de domestication Nord et ceux d'origine de la voie Sud (Rochus et al., 2018). Les races de massifs que j'ai étudiées (NVE, LAC et BMC, Figure 63) ont une origine méridionale et semblent appartenir à un même ensemble phylogénétique qui laisse penser que les mutations identifiées auraient une même origine ancestrale antérieure à la création de ces trois races, mais qui reste à démontrer.

En ce qui concerne la mutation *FecX<sup>Gr</sup>*, la relation phylogénétique entre la race de massif Grivette et la race nordique Mouton Vendéen est moins évidente et encore moins avec les races espagnoles Rasa Aragonesa, Ovella Galaga ou encore Romanov, d'origine russe. Entre les races Grivette et Mouton Vendéen, la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* pourrait trouver son origine dans la population Mouton Vendéen plutôt que dans la race Grivette, où elle a été identifiée. En effet, la fréquence de la mutation de 5 % est relativement importante dans la race Mouton Vendéen qui n'est pas particulièrement sélectionnée pour la prolificité. De plus, des béliers Moutons Vendéens sont utilisés régulièrement en croisement terminal par les éleveurs Grivette dans le but d'améliorer les qualités bouchères des agneaux.

En partant de la simple hypothèse que certaines femelles, issues de ces croisements, aient été conservées pour les renouvellements et du fait qu'un mâle porteur d'une mutation sur le chromosome X la transmet à toutes ces filles, la mutation a pu se propager dans les troupeaux Grivette qui sont sélectionnés pour la prolificité. La découverte de *FecX<sup>Gr</sup>* dans la race rustique nordique Flemish pourrait favoriser l'hypothèse de l'origine de cette mutation dans la race Mouton Vendéen classée aussi parmi les races du Nord (Figure 63).



Au final, et pour tenter de répondre à la question de l'origine de ces mutations, il pourrait être envisagé le séquençage de génome complet d'animaux porteurs des mêmes mutations dans les différentes races de façon à visualiser la longueur des haplotypes locaux porteurs des allèles mutés et ainsi pouvoir hiérarchiser dans le temps les races entre elles, sur le principe que plus l'haplotype est court, plus la mutation est ancienne, son environnement local ayant subi plus de recombinaisons au cours des générations.

## B. Robustesse de l'effet prolifique des mutations dans différentes populations

En dehors du questionnement sur l'origine et la diffusion de ces mutations entre races, la présence d'une même mutation dans des fonds génétiques différents pose la question de la robustesse de son effet sur la prolificité. Les nombreux programmes d'introgression de la mutation Booroola, *FecB<sup>B</sup>* pour améliorer la prolificité de races peu prolifiques montrent bien l'efficacité de cette approche (Walkden-Brown et al., 2009). À titre d'exemple, la mutation a été introgressée avec succès dans la race Deccani permettant ainsi d'augmenter la taille de portée moyenne à 1,2 agneau chez les brebis B/+ contre 0,9 chez les +/+. De la même façon, des croisements entre les races Garole et Malpura (porteuse de *FecB<sup>B</sup>*) ont permis d'augmenter le taux de sevrage en plus de la prolificité. La productivité de ces brebis croisées est améliorée grâce à des poids plus élevés de leurs agneaux à la naissance, au sevrage et à 6 mois.

Dans les populations étudiées dans cette thèse j'ai pu avoir accès à deux niveaux d'échantillonnages pour estimer la fréquence et l'effet sur la prolificité des mutations découvertes. Dans un cas, mes résultats se basent sur les génotypages et les données de tailles de portée d'une à quelques centaines de brebis ne me permettant de comparer que des données brutes. Dans l'autre cas, j'ai pu réaliser un à plusieurs milliers de génotypages et collecter les performances de prolificités associées permettant d'appliquer des modèles de corrections statistique des données pour approcher les estimations les plus réalistes possibles de l'effet de ces mutations.

Dans le cas des petits effectifs, toutes les données obtenues mériteraient d'être confortées par l'acquisition de génotypes supplémentaires. Néanmoins, avec les données acquises, j'ai pu observer que la mutation *FecX<sup>Gr</sup>* qui ségrége en Rasa Aragonesa augmente la prolificité de +0,41 agneau par mise-bas ce qui est comparable à l'effet estimé après correction des effets d'environnement de +0,30 en Mouton Vendéen (Article 1 ; Chantepie et al., 2018). Ces chiffres sont difficilement comparables à ceux disponibles en race Grivette qui portent sur un

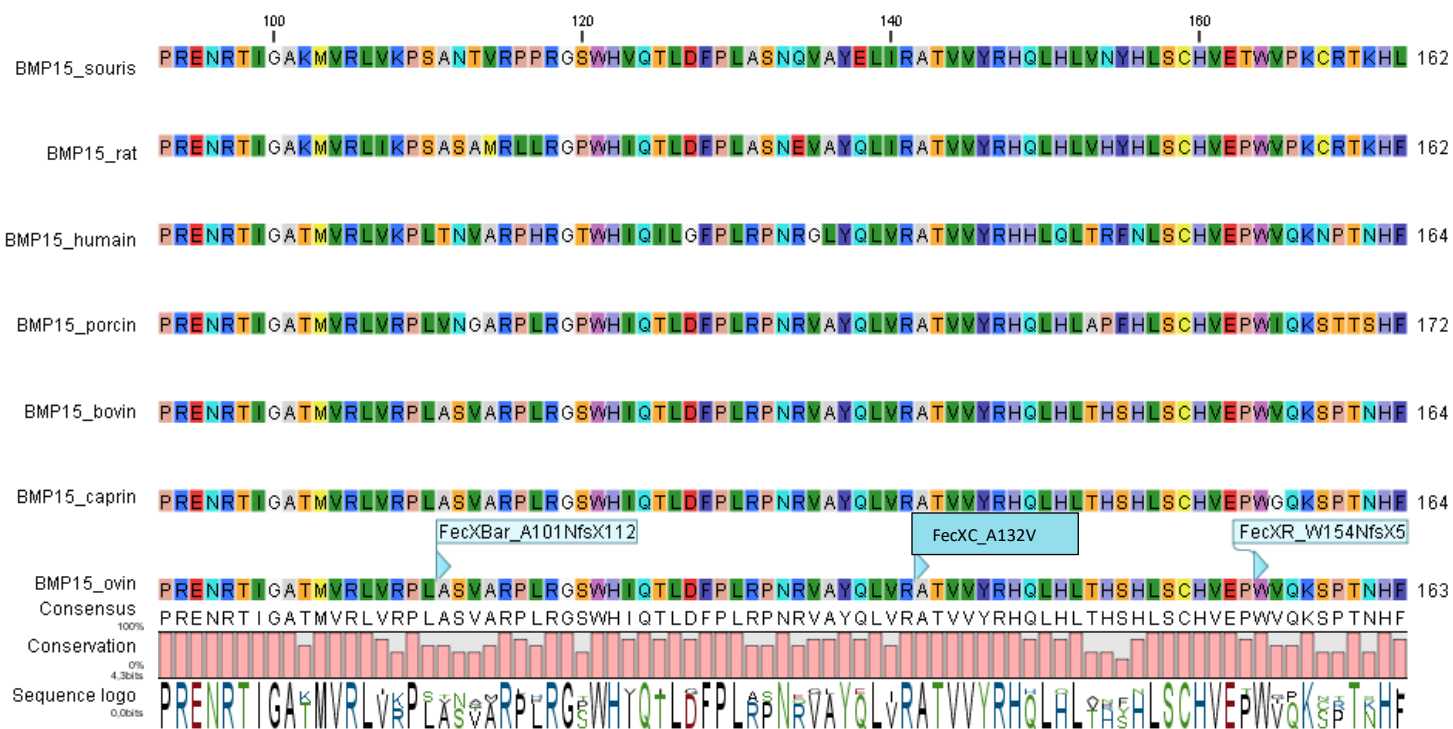


Figure 64: Conservation des acides aminés de la protéine BMP15 entre les positions p.83-163 de plusieurs espèces.

effectif un peu biaisé, avec +0,1 pour la première copie de l'allèle et +0,58 pour la seconde copie (Demars et al., 2013). Un effet comparable d'environ +0,30 agneau par mise -bas est également retrouvé pour la mutation *FecG<sup>E</sup>* que ce soit en race Martinik Black Belly ou en race Santa Inès (Silva et al., 2010).

Dans le cas où j'ai pu travailler sur de grands effectifs, et calculer un effet corrigé pour les conditions d'environnement, j'ai pu observer que la mutation *FecL<sup>L</sup>* avait un effet très proche de +0,42 agneau par mise-bas en Noire du Velay (Article 1 ; Chantepie et al., 2018); Article 2, Chantepie et al. Soumis) et +0,47 en Lacaune (Martin et al., 2014). Cet effet assez fort de la mutation *FecL<sup>L</sup>* se maintient à +0,3 agneau par mise-bas en race D'Man dans des conditions climatiques et d'élevages certainement moins favorables qu'en France pour l'expression du caractère de prolificité (Ben Jemaa et al., 2018). Pour la nouvelle mutation *FecX<sup>N</sup>* présente en races Noire du Velay et Blanche du Massif Central, là encore son effet est identique (+0,20 agneau par mise-bas) pour les deux races. Je peux difficilement estimer son effet dans la race Belle-Île à petits effectifs, par une variabilité importante entre élevages et un manque d'enregistrement de taille de portée. Cependant, la comparaison des moyennes brutes entre porteuses et non porteuses de *FecX<sup>N</sup>* donne également un effet de +0,20 agneau par mise-bas.

L'ensemble de ces données montrent bien la « robustesse » des effets de ces mutations de prolificité quel que soit le fond génétique et ouvre des perspectives pour l'introgession de ces mutations dans des populations peu prolifiques qui souhaiteraient progresser sur ce caractère.

## C. Impact fonctionnel des nouvelles mutations découvertes dans *BMP15*

### 1) *FecX<sup>C</sup>* – Mutation Causse du Lot

Lors de ma recherche d'une mutation pouvant expliquer la prolificité extrême de certaines brebis en race Causse du Lot, j'ai identifié un nouveau polymorphisme c.395C>T dans l'ADNc de *BMP15* non référencé dans les bases de données SNP. L'allèle variant T que j'ai nommé *FecX<sup>C</sup>*, induit une substitution d'une alanine par une valine en position 132 sur la séquence de la protéine (p.A132V). Ce changement se fait entre deux acides aminés à chaîne latérale hydrophobe proches en structure qui laisserait penser à un impact minimal de la substitution sur la fonction de *BMP15*. Cependant, la position de l'alanine et des autres acides aminés qui l'entoure apparaît conservée entre espèces (Figure 64).

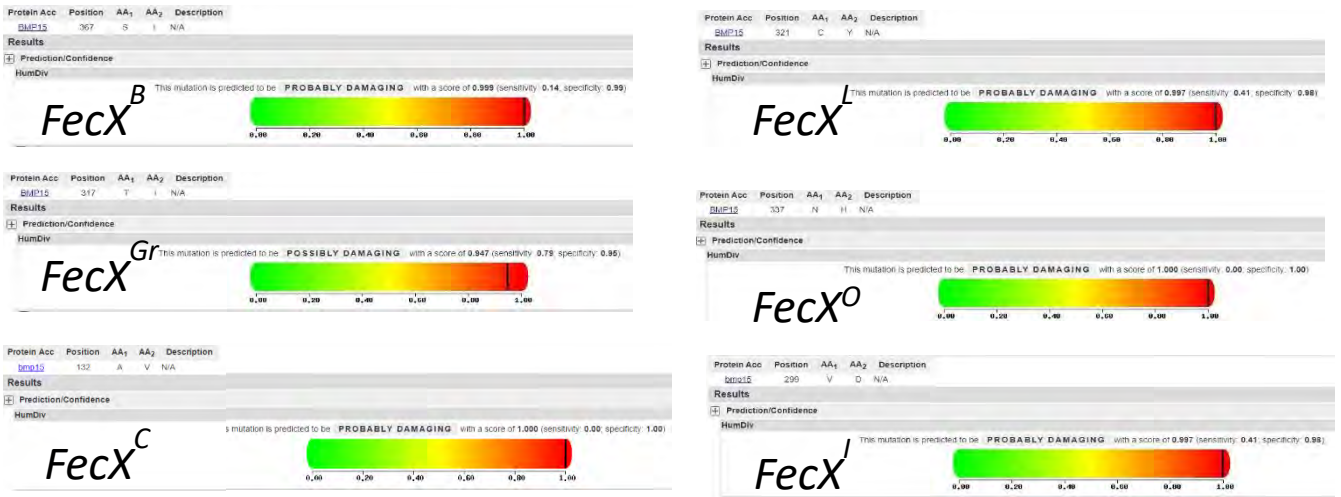


Figure 65: Prédiction des mutations *FecX* sur l'effet fonctionnel de la protéine BMP15 par PolyPhen-2.

Le curseur noir indique la force de l'effet de dommage présumé sur la fonction de la protéine pour le SNP, évalué à l'aide du prédicteur HumDiv.

De plus, l'utilisation de l'outil bio-informatique PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) pour la prédiction d'effet fonctionnel des SNP indique une forte probabilité d'altération de la fonction de BMP15, à l'image de celle observée pour toutes les autres mutations causales connues dans BMP15 (Figure 65). Néanmoins, cette mutation ne semble pas être associée à une augmentation de la prolificité dans la race Causse du Lot. Le faible nombre d'animaux génotypés (une centaine) et le manque d'information de paternité enregistrée dans la base de données OVALL qui pourrait nous permettre de déduire facilement des filles porteuses hétérozygotes à partir de mâles porteurs, ne m'a pas permis de conclure sur l'effet de ce polymorphisme. Il faudrait donc avoir accès à une cohorte de renouvellement comme ce que j'ai fait pour les races Mouton Vendéen ou Blanche du Massif Central, pour estimer réellement l'effet de *FecX<sup>C</sup>*. Cependant, la population Causse du Lot est la plus grosse population ovine allaitante en France (26500 brebis en contrôle de performance, (IDELE, 2019) ce qui nécessiterait près de 5000 génotypages (20% de l'effectif de brebis). Avant de lancer un tel chantier de prélèvement d'échantillons, il serait souhaitable de contrôler fonctionnellement l'impact de *FecX<sup>C</sup>* par une approche d'expression de protéine recombinante dont on testerait la capacité de synthèse et de production comme pour *FecX<sup>L</sup>* (Bodin et al., 2007) et/ou l'activité de signalisation cellulaire *in vitro* via les protéines SMADs comme ce qui a été réalisé au laboratoire pour les mutations *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecX<sup>O</sup>* (Demars et al., 2013).

*FecX<sup>C</sup>* est située dans le pro-domaine de BMP15. Ce n'est pas la seule mutation découverte ayant un effet sur la prolificité située dans le pro-domaine de BMP15, mais c'est la seule qui n'entraînant qu'une substitution d'acide aminé. En effet, toutes les autres mutations causales du pro-domaine, *FecX<sup>B</sup>*, *FecX<sup>R</sup>* ou *FecX<sup>Bar</sup>* entraînent l'apparition prématurée d'un codon stop, avec ou sans changement préalable du cadre de lecture qui empêche la production de la protéine et de son peptide mature (Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017; Martinez-Royo et al., 2008). Il faut envisager que *FecX<sup>C</sup>* soit un polymorphisme n'ayant pas d'influence sur l'activité de BMP15 et par voie de conséquence sur le fonctionnement de l'ovaire et la prolificité. Ainsi, la délétion d'une leucine en position 10 dans le pro-domaine de BMP15 repérée dans différentes races ovines n'est pas associée à la prolificité (Demars et al., 2013; Hanrahan et al., 2004; Lassoued et al., 2017).





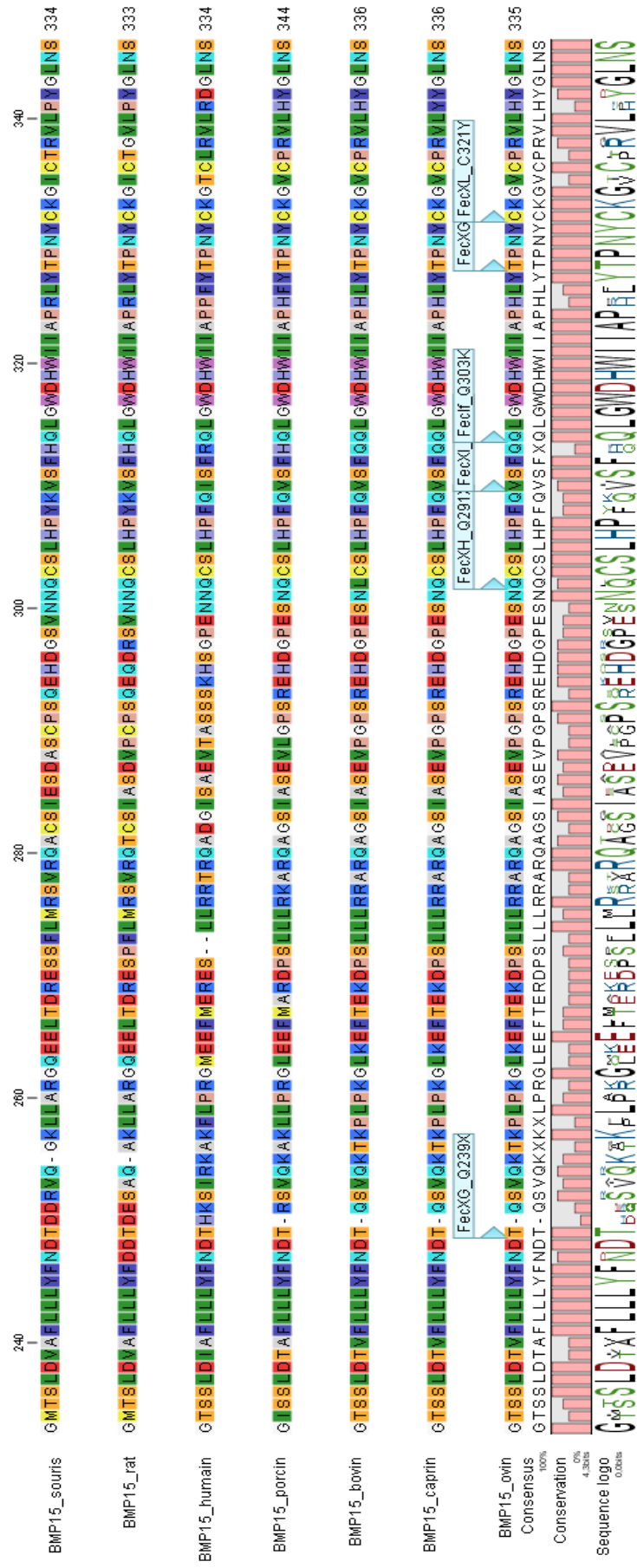


Figure 66: Conservation des acides aminés de la protéine BMP15 de la région p.223-335 de plusieurs espèces.

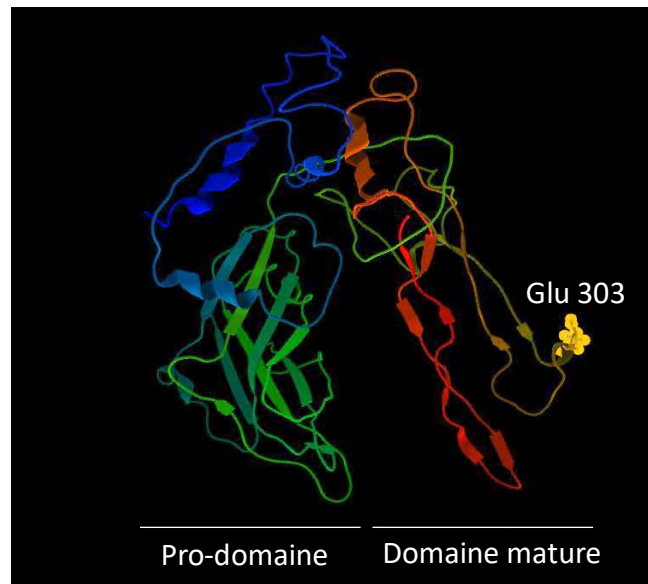


Figure 67 : Représentation 3D de la protéine BMP15 et localisation de la mutation p.Q303K.

## 2) *FecX<sup>lf</sup>* – Mutation Ile de France

Après l'échec de la recherche dans la population française d'Ile-de-France de la mutation *FecG<sup>v</sup>* identifiée au Brésil, j'ai identifié chez des béliers avec un index de prolificité élevé un nouveau polymorphisme c.907C>A dans l'ADNc de *BMP15*, lui aussi, non référencé dans les bases de données SNP. L'allèle variant A nommé *FecX<sup>lf</sup>*, induit sur la protéine une substitution non-conservative dans le domaine mature de BMP15 (p.Q303K) qui change une glutamine (polaire et non chargée) en lysine (polaire et chargée positivement). Cette mutation localisée dans un domaine très conservé entre espèces (Figure 66), est prédite avec une forte probabilité d'altération de la fonction de *BMP15* par l'outil bio-informatique PolyPhen-2 (Figure 44 page 61). En effet, la glutamine 303 est située à l'extrémité d'une des deux boucles de feuillet beta (Figure 67) qui seraient en interaction avec les récepteurs de type 1 et 2 d'après les modélisations de structures tridimensionnelles (Mottershead et al., 2015 ; Figure 67). De la même façon que ce que j'ai proposé précédemment pour *FecX<sup>C</sup>*, il faudrait développer un test d'expression et d'activité *in vitro* pour confirmer cette altération fonctionnelle présumée de BMP15 qui pourrait passer par une moindre affinité pour les récepteurs BMPR1B et BMPR2, se traduisant par une baisse ou perte d'activité de signalisation via les protéines SMADs.

Contrairement à *FecX<sup>C</sup>*, pour laquelle j'ai des doutes sur sa causalité, la mutation *FecX<sup>lf</sup>* est associée à une augmentation de la prolificité estimée à +0,13 agneau par mise-bas et laisse donc bien penser que l'activité biologique de BMP15 pourrait être affectée. Cependant, l'effet observé sur les moyennes brutes de prolificité entre les génotypes *FecX<sup>+</sup>/FecX<sup>+</sup>* et *FecX<sup>+</sup>/FecX<sup>lf</sup>* est peu important en comparaison des autres mutations du gène *BMP15*, de +0,3 avec *FecX<sup>Gr</sup>* à +1,0 avec *FecX<sup>B</sup>* (Tableau 5 page 47). Cette observation pourrait suggérer un effet relativement modéré de *FecX<sup>lf</sup>* sur l'activité biologique de BMP15. De plus, n'ayant pas trouvé de brebis homozygotes porteuses de *FecX<sup>lf</sup>*, je ne peux pas conclure sur la possible stérilité de ces brebis qui amènerait un argument fonctionnel supplémentaire. Il est donc nécessaire de génotyper un plus grand nombre d'animaux de la population Ile-de-France afin de mieux estimer l'effet de *FecX<sup>lf</sup>* et aussi de génotyper plus spécifiquement des agnelles issues de croisements entre brebis et béliers porteurs de la mutation pour attribuer un phénotype aux brebis homozygotes.



### 3) *FecX<sup>N</sup>* – Mutation Noire du Velay

La découverte et le génotypage de la mutation *FecL<sup>L</sup>* dans la population Noire du Velay m'a permis d'apporter une partie de l'explication du déterminisme génétique de la prolificité dans cette race. Cependant, j'ai pu observer des animaux hautement prolifiques parmi les brebis non porteuses de *FecL<sup>L</sup>*. En étudiant ces brebis, j'ai pu apporter un élément supplémentaire à ce déterminisme génétique en mettant en évidence la mutation *FecX<sup>N</sup>* issue d'un SNP en amont du gène *BMP15*. À la différence des 9 autres mutations causales publiées du gène *BMP15*, la mutation *FecX<sup>N</sup>* n'est donc pas située dans le cadre de lecture du gène *BMP15* et n'altère pas sa séquence protéique, posant ainsi la question de son rôle fonctionnel pour tenter d'expliquer l'augmentation associée de prolificité de +0,2 agneau par mise-bas.

La littérature offre peu d'exemples de polymorphismes des gènes de prolificité en dehors de la séquence codante de ces gènes et associés à un phénotype. Le premier est celui de la mutation de prolificité *FecL<sup>L</sup>* située dans l'intron 7 du gène *B4GALNT2* et associée à une surexpression ectopique de ce gène dans les cellules de la granulosa des follicules des brebis mutées (Drouilhet et al., 2013).

Si le mécanisme moléculaire précis du mode d'action de cette mutation sur la régulation de l'expression de *B4GALNT2* n'est pas encore connu, j'apporterai des éléments supplémentaires quant à ses conséquences sur l'endocrinologie dans la seconde partie de cette thèse.

Concernant *BMP15*, un SNP situé dans la partie 5'UTR (c.-9C>G) est associé avec certaines formes d'insuffisances ovariennes précoces (Dixit et al., 2006), mais également avec un syndrome d'hyperstimulation ovarienne induite par les traitements gonadotropes chez la femme (Morón et al., 2006). L'hypothèse avancée de l'action de ce SNP serait sur l'expression ovocytaire du gène *BMP15*, via une augmentation de la capacité de fixation d'un facteur transcriptionnel, PITX1 dans cette région promotrice du gène (Fonseca et al., 2014). D'autres indications indirectes sur l'importance de la régulation transcriptionnelle des gènes de prolificité, sans relation avec des polymorphismes génétiques, montrent que l'accumulation des ARNm de *BMP15* et *GDF9* est réduite dans les follicules primordiaux, primaires et secondaires chez des patientes atteintes d'un syndrome des ovaires polykystiques SOPK (Wei et al., 2014). De plus, le rapport d'expression entre *BMP15* et *GDF9* semble être un déterminant important du caractère mono ou poly-ovulant d'une espèce (Christoforou and Pitman, 2019; Crawford and McNatty, 2012). Ces éléments sont autant d'arguments pour penser que la mutation *FecX<sup>N</sup>* pourrait agir via un mécanisme de régulation de l'expression ovocytaire du gène *BMP15* chez la brebis. *In vitro*, j'ai pu déterminer par une analyse de transcription/traduction que *FecX<sup>N</sup>* ne semblait pas impacter la capacité de transcription puis de

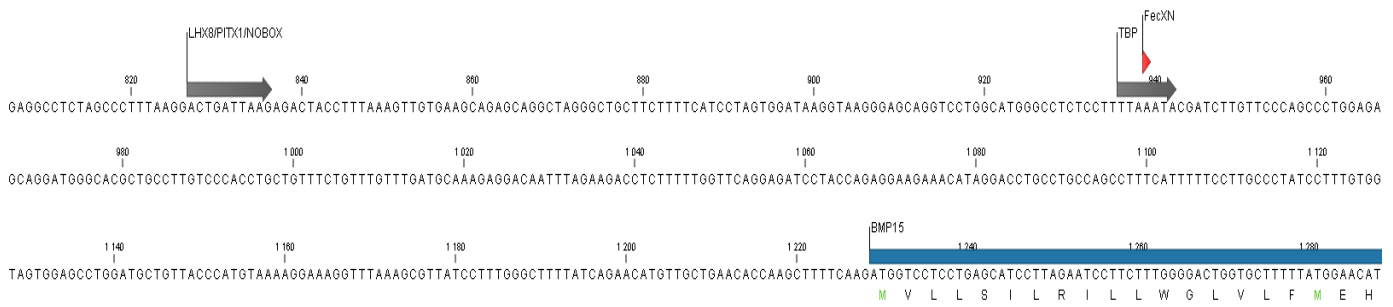


Figure 69 : Position du site consensus de liaison des facteurs LHX8, NOBOX, PITX1 et TBP en regard de la mutation *FecX<sup>N</sup>*.

Le début de la région traduite du gène *BMP15* est représenté en bleu. La position de la mutation *FecX<sup>N</sup>* est annoté par une flèche rouge. La flèche grise représente le site de liaison des facteurs LHX8, NOBOX et PTX1 et TPB : TATA-binding protein.

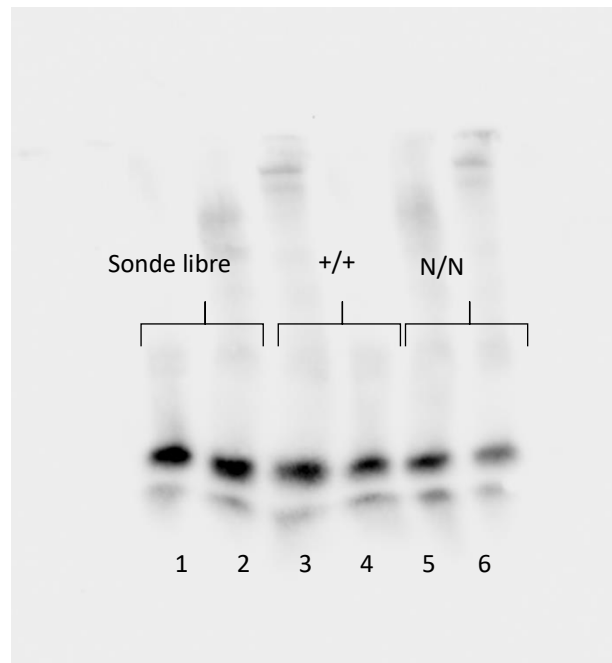


Figure 68: Retard sur gel d'un fragment de PCR incluant *FecX<sup>N</sup>* en présence d'extraits nucléaires ou cytoplasmiques de cellules CHO.

1 et 4 : sondes libres ; 2 et 5 en présence d'extraits nucléaires, 3 et 6 en présence d'extraits cytoplasmiques

traduction à partir de l'ADNc de BMP15. En revanche, lorsque la partie promotrice de *BMP15* (entre -743 et -11pb en amont de l'ATG) contrôle l'expression d'un gène rapporteur luciférase, il apparaît que *FecX<sup>N</sup>* a une action inhibitrice de cette activité. Là encore, la littérature est assez pauvre concernant les sites de liaison des facteurs de transcription qui pourraient agir au niveau du promoteur de *BMP15*. Des sites consensus de liaison des facteurs LHX8, NOBOX et PITX1 ont été repérés au niveau du promoteur du gène *BMP15* porcin mais seul le site LHX8 semble avoir un rôle fonctionnel (Wan et al., 2015). Par homologie de séquence, j'ai replacé ces sites sur la séquence promotrice ovine (Figure 69), mais ils sont à distance de la position de *FecX<sup>N</sup>*. En utilisant par la suite le logiciel Genomatix et son outil MatInspector (<https://www.genomatix.de>) la seule hypothèse d'action de *FecX<sup>N</sup>* pourrait être une altération d'une séquence de type TATA-box (TTAAATA>TTATATA) pour la fixation potentiel de TBP (TATA-binding protein), le facteur crucial d'initiation de la transcription chez les eucaryotes (pour revue, Kramm et al., 2019; Figure 69). Malheureusement, par une approche d'incubation d'extraits nucléaires de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) avec le fragment de promoteur de *BMP15* portant ou non *FecX<sup>N</sup>*, puis de visualisation d'un retard de migration sur gel d'acrylamide, je n'ai pas pu démontrer la fixation de protéines nucléaires sur ces fragments (Figure 68).

Cependant, par l'approche de RT-qPCR sur des ARN extraits des ovocytes de brebis homozygotes porteuses et non porteuses de *FecX<sup>N</sup>*, j'ai pu montrer une accumulation deux fois plus faible des ARNm de *BMP15* chez les brebis mutées, laissant penser que *FecX<sup>N</sup>* pourrait agir négativement sur l'expression ovocytaire *in vivo* de *BMP15*, sans affecter celle de *GDF9*. Cette observation au niveau des ARN pourrait être vérifiée au niveau protéique par une approche de western blot sur les liquides folliculaires qui accumulent BMP15 et GDF9 (Heath et al., 2017). Néanmoins, l'analyse statistique de cette différence en ARN n'est pas significative au seuil de 5%. En effet, pour des raisons logistiques de disponibilité d'achats d'animaux dans les élevages, j'ai dû cumuler des données assez variables dans les deux races Noire du Velay et Blanche du Massif Central pour obtenir des effectifs de 5 brebis pour chaque génotype. De façon à vraiment conforter cette tendance dans une seule race, il faudrait utiliser soit des brebis hétérozygotes disponibles en nombre plus important, mais avec le risque d'un effet différentiel moindre, soit de générer nous-même en installation expérimentale les brebis homozygotes porteuse de *FecX<sup>N</sup>*. Nous n'avons pas fait le choix de cette option à cause du délai nécessaire pour l'obtention de ce génotype chez des brebis adultes avec un phénotype prolifique établi.





Quoiqu'il en soit, l'ensemble des données que j'ai pu acquérir sur les conséquences fonctionnelles de *FecX<sup>N</sup>* sur *BMP15*, m'amènent à penser que cette mutation, en agissant négativement sur l'activité promotrice de *BMP15* et en limitant son expression dans l'ovocyte, induit une « perte de fonction », à l'image des autres mutations de proliféricité dans *BMP15*, comme mécanisme initiateur de régulation de l'activité ovarienne conduisant à l'hyperprolifericité (Fabre et al., 2006; Persani et al., 2014).



## Partie 2 – Caractérisation des conséquences physiologiques de la mutation *FecL<sup>L</sup>*

Dans la première partie des résultats de cette thèse, j'ai identifié la ségrégation de mutations à effet majeur sur la prolificité dans de nombreuses populations ovines en France et en Europe. Mais après cette phase de découverte, la gestion de ces mutations, dans les populations où elles ont été découvertes, est maintenant un enjeu majeur des schémas de sélection de ces races allaitantes. Les organismes de sélection en charge de ces populations doivent prendre des décisions quant à la prise en compte ou non de cette information génétique. Si tous les organismes de sélection ont pour objectif d'atteindre, grâce à la génétique, un optimum pour la rentabilité économique des élevages, rares sont ceux qui incluent la gestion d'une mutation de prolificité. C'est le cas du schéma de sélection OVIT-EST en race Lacaune allaitante, dont l'objectif est d'obtenir 50% des agnelles de renouvellement porteuses hétérozygotes de la mutation prolifique *FecL<sup>L</sup>* (Martin et al., 2014). Pour rappel, *FecL<sup>L</sup>* a un effet sur la production de +0,47 agneau par mise-bas pour les brebis hétérozygotes et les études technico-économiques réalisées indiquent une augmentation de la marge brute de 12%, avec en moyenne un gain de revenu de 21€ par agnelage et par brebis (B. Giral, directrice d'OVI-TEST, communication personnelle).

Si l'effet sur la prolificité est évident, OVI-TEST s'est associé avec le laboratoire d'accueil INRA de cette thèse dans le cadre du projet PIRRINOVI, afin de connaître les effets connexes de *FecL<sup>L</sup>* sur d'autres paramètres, permettant une gestion efficace d'un point de vue technique, économique et environnemental des troupeaux par les éleveurs adhérents. Des résultats antérieurs à cette thèse apportent quelques éléments, comme une fertilité améliorée des brebis porteuses de *FecL<sup>L</sup>*, mais avec des agneaux dans leurs portées ayant un poids de naissance plus faible et une mortalité plus élevée que les brebis non porteuses à taille de portée équivalente (Martin et al., 2014). De plus, les profils hormonaux endogènes des hormones gonadotropes et de la progestérone sont impactés par la présence de *FecL<sup>L</sup>* (Drouilhet, 2010).

Ainsi, dans le cadre du projet PIRINNOVI, mon second objectif de thèse était d'acquérir des connaissances sur les effets de l'allèle de prolificité *FecL<sup>L</sup>* sur la mortalité et la croissance des agnelles porteuses de la mutation, leur âge à la puberté et leur fertilité sur œstrus naturel. De plus, considérant le contexte réglementaire visant à réduire, voire à éliminer l'utilisation d'hormones à usage vétérinaire, il était également important d'évaluer les interactions qui peuvent exister entre



l'allèle prolifique *FecL<sup>L</sup>* et l'utilisation de traitements hormonaux pour la synchronisation des cycles oestriens en vue de l'Inséminations Animales (IA) très utilisée dans le schéma de sélection OVI-TEST. En effet, ces traitements (éponges intra vaginales de progestagène et injection de PMSG, Pregnant Mare Serum Gonadotropin) servent à la pratique de l'IA en contre-saison, en période d'anoestrus, pour optimiser la fertilité et la prolificité, ainsi que pour l'utilisation de l'IA à temps fixe.

Pour répondre à cet objectif, je me suis appuyée d'une part sur le suivi depuis leur naissance d'agnelles Lacaune en installation expérimentale INRA (numéro d'agrément C31-429-01 du 15/04/16 à l'expérimentation animale) et, lorsque c'était possible, sur des résultats collectés en élevages commerciaux du schéma de sélection OVI-TEST. Pour la partie expérimentale, afin d'établir des profils endocriniens, de nombreux résultats sont issus de dosages hormonaux décrits dans les procédures expérimentales (PE 15), placées en annexe. L'ensemble des protocoles de cette partie de la thèse, faisant appel à des animaux expérimentaux, ont été approuvés par le comité d'éthique en expérimentation animale n°115 et autorisés dans le projet « Déterminisme génétique de la prolificité en races ovines » sous la référence 01171.02 du 25/04/16 (Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche).

## I. Effet de *FecL<sup>L</sup>* de la naissance à la première mise-bas

Quatre-vingt brebis Lacaune issues du schéma OVITEST (*FecL<sup>+</sup>/FecL<sup>+</sup>* n= 66 ; *FecL<sup>L</sup>/FecL<sup>+</sup>* n=14) ont été achetées dans deux élevages commerciaux, dans le but de générer des agnelles de génotypes *+/+* et *L/+* au locus *FecL* par IA avec de la semence congelée de 8 béliers Lacaune (*+/+* n= 2 ; *L/+* n=6) ou, en monte naturelle avec un bélier *L/L* pour les retours en œstrus des brebis pour lesquelles l'IA n'avait pas fonctionné. L'ensemble des animaux a été élevé au sein de l'installation expérimentale du domaine de Langlade (INRA, Toulouse). Au bilan, 53 agnelles sont nées de ces accouplements et j'ai sélectionné, sur la base du génotype, de la date de naissance et du pedigree, 43 agnelles (*+/+* n=20 ; *L/+* n= 23) afin de réaliser un suivi de leur croissance (une pesée tous les 14 jours) et de leur profil hormonal circulant (progestérone, FSH, AMH et inhibine A, une prise de sang par semaine ou tous les 14 jours, PE 10) de leur naissance à leur première mise-bas.



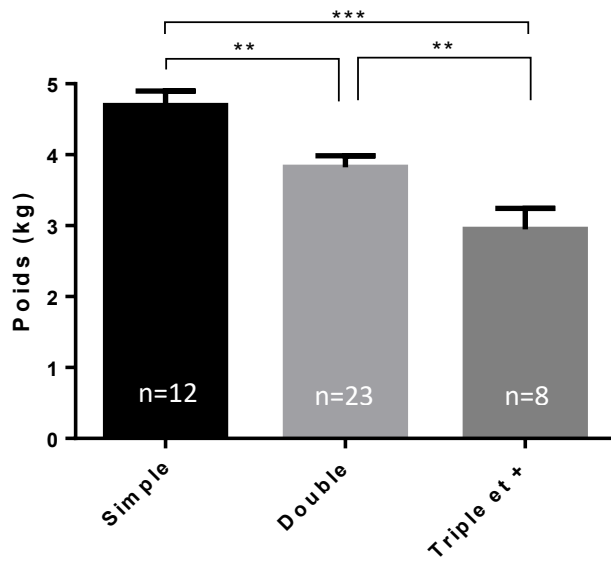


Figure 70: Effet du mode de naissance sur le poids de naissance.

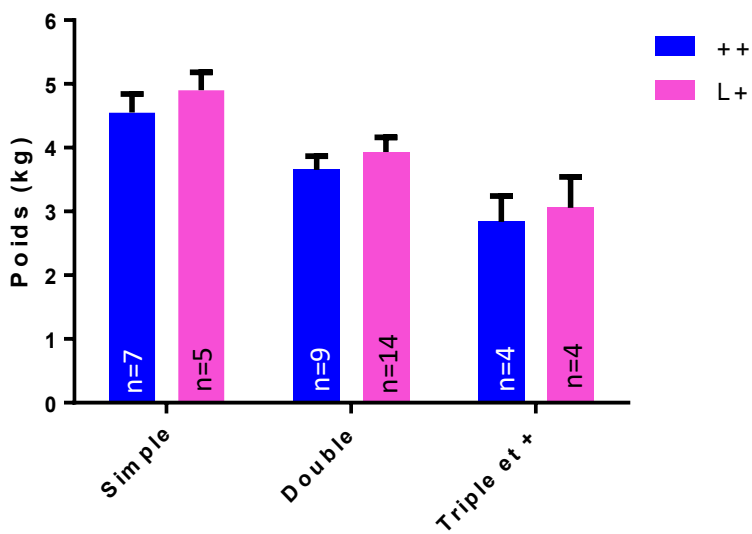


Figure 71: Effet du génotype  $Fecl^L$  par mode de naissance sur le poids de naissance.

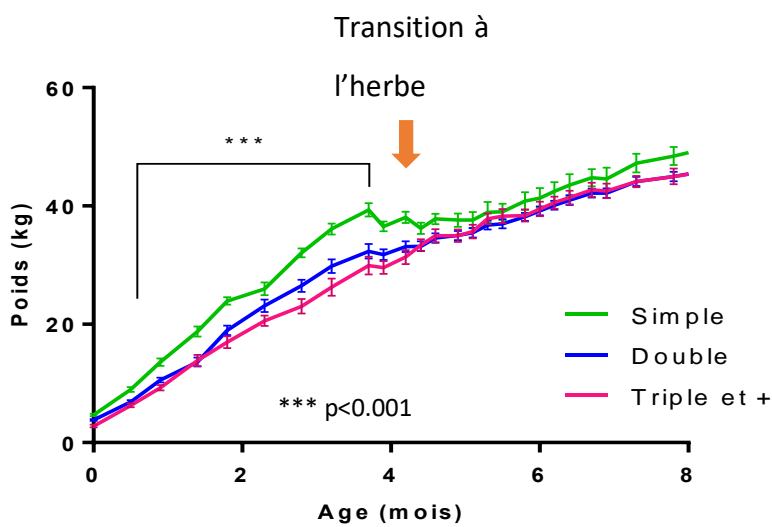


Figure 72: Croissance des agnelles entre 0 et 8 mois en fonction du mode de naissance.

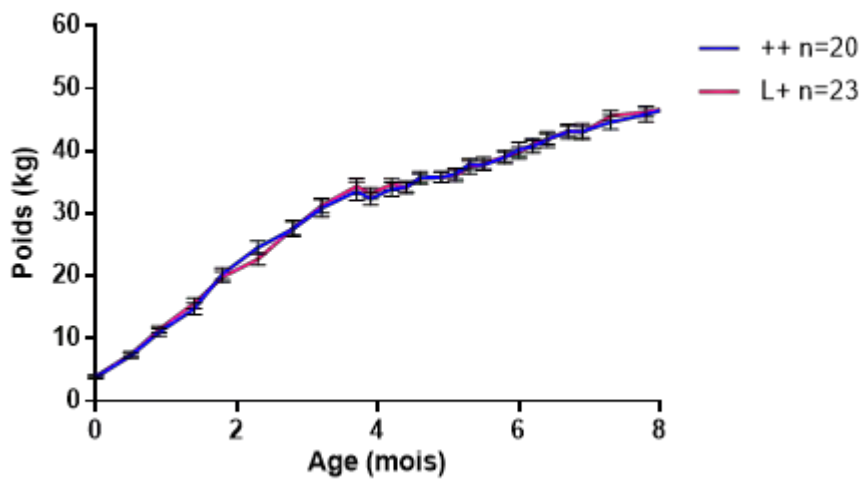


Figure 73: Croissance des agnelles entre 0 et 8 mois en fonction de leur génotype au locus FeCL.

Tableau 25 : GMQ 0-30 et 30-70 en fonction du génotype et du mode de naissance des agnelles Lacaune.

	GMQ 0-30 (gr/j)	GMQ 30-70 (gr/j)
Moyenne	266 (± 80)	303 (± 59)
+/+	260 (± 70)	299 (± 57)
L/+	271 (± 59)	307 (± 59)
Simple	270 (± 81)	320 (± 47)
Double	277 (± 87)	302 (± 65)
Triple et plus	231 (± 71)	276 (± 54)



## A. Poids de naissance

Dans la Figure 70, sont représentées les moyennes des poids de naissance des agnelles en fonction du mode de naissance (née simple, double ou triple et plus) indépendamment du génotype de l'agnelle au locus *FecL*. Le mode de naissance a un effet très significatif sur le poids à la naissance ( $p < 0,0001$ ). Les agnelles nées simples sont significativement plus lourdes que celles nées doubles ( $p < 0,01$ ) et que les nées triples et plus ( $p < 0,0001$ ). De la même façon, les nées doubles sont significativement plus lourdes à la naissance que les nées triples et plus ( $p < 0,01$ ). Néanmoins, le génotype des agnelles au locus *FecL* n'influence pas le poids de naissance, quel que soit le mode de naissance (Figure 71).

## B. Croissance et Gain Moyen Quotidien (GMQ)

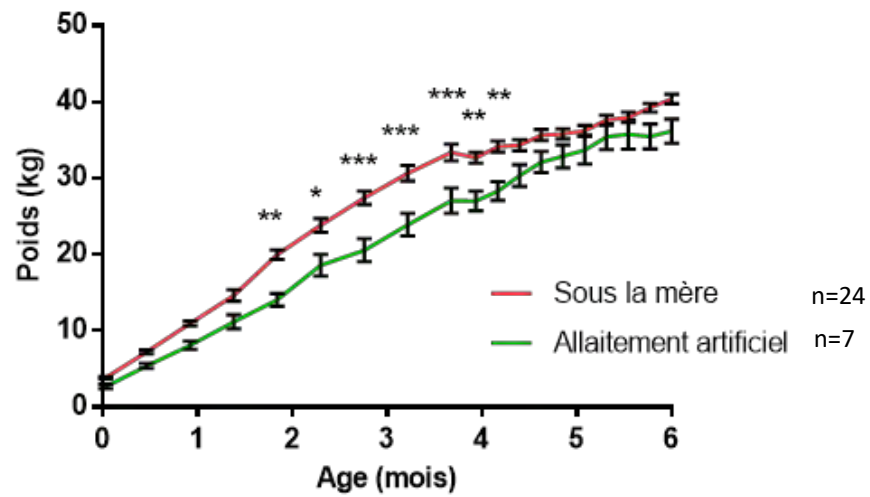
Au cours des deux premiers mois de la vie de l'agneau, l'alimentation lactée constitue l'essentiel de sa ration et dépend des qualités maternelles de sa mère. On remarque que les agnelles nées simples sont toujours plus lourdes jusqu'à l'âge de 4 mois ( $p < 0,0001$ ), mais que les courbes des agnelles nées doubles ou triples et plus se confondent (Figure 72). À partir de 4 mois, les agnelles les plus lourdes ont été placées au pâturage. À cause de la transition alimentaire, nous avons observé une perte de poids due à des diarrhées. Les nées simples sont plus particulièrement touchées car elles faisaient toutes, ou presque, partie de ce lot. Après l'âge de 4 mois, plus aucune différence sur le poids n'est observée entre les modes de naissance.

Comme pour le poids de naissance, le génotype des agnelles n'a pas d'effet sur la courbe de croissance jusqu'à 8 mois d'âge (Figure 73).

L'indicateur GMQ (Gain Moyen Quotidien) est très utilisé en élevage afin de valider que la croissance des agneaux se déroule de façon optimale et permet d'anticiper la vente des agneaux pour la commercialisation de la viande. Le GMQ 0-30 jours permet de mesurer la qualité laitière de la brebis alors que le GMQ 30-70 jours permet d'estimer la précocité de croissance de l'agneau. Dans le cadre de ce protocole, nous avons obtenu les résultats présentés dans le Tableau 25.

Il n'y a aucune différence en ce qui concerne le GMQ que ce soit en fonction du génotype des agnelles ou de leur mode de naissance. Les valeurs obtenues pour le GMQ 30-70 sont similaires à la seule donnée que l'on peut retrouver en élevage pour les jeunes mâles Lacaune nés simples de 335 gr/jour (Loywyck et al., 2019).





\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$

Figure 74: Évolution du poids en fonction du mode d'allaitement chez les agnelles nées multiples.

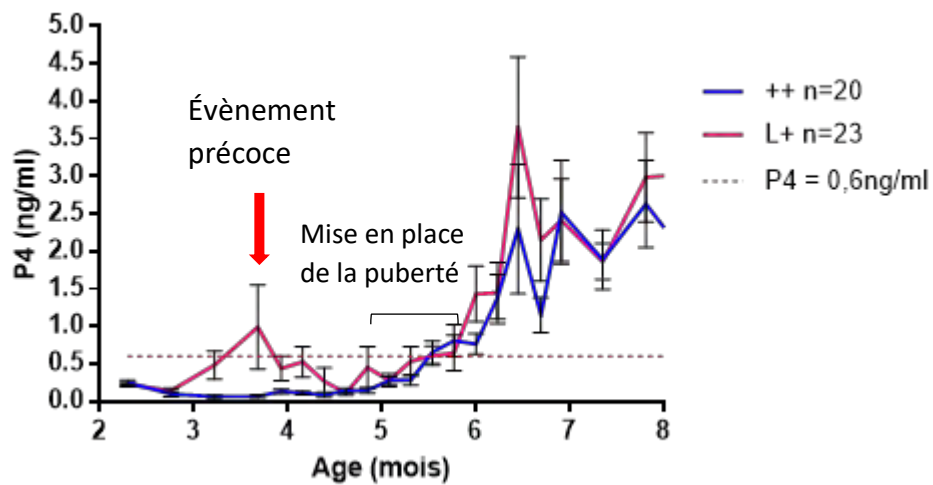


Figure 75: Dosage de P4 en fonction du génotype au locus L chez des agnelles Lacaune entre 0 et 8 mois.

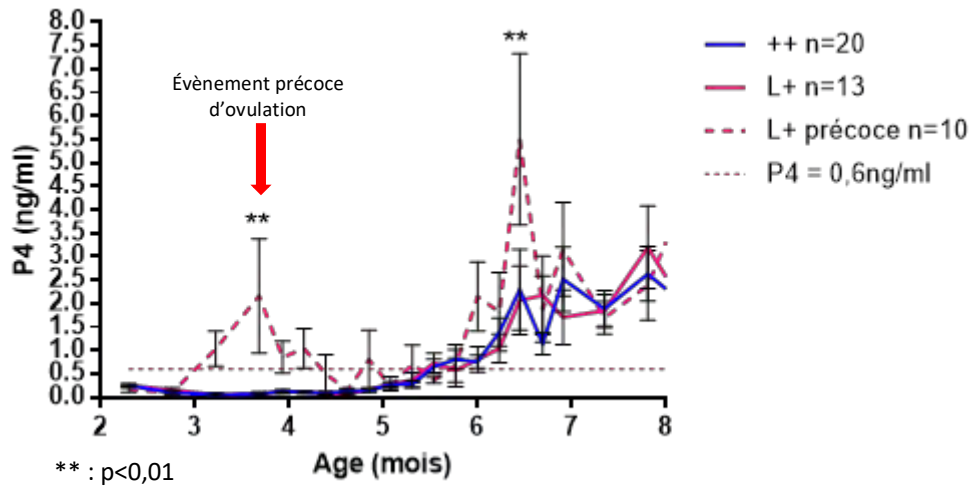


Figure 76: Dosage de P4 en fonction du génotype au locus L et de la précocité, chez des agnelles Lacaunes entre 0 et 8 mois.

Tableau 26: Dosage de P4 pour chaque agnelle Lacaune.

Age en jours	++										L+																																			
	72464	72475	72478	72484	72487	72491	72497	72521	72522	72524	72534	72539	72543	72547	72548	72549	72551	72559	72562	72569	72476	72477	72482	72488	72490	72492	72493	72500	72502	72505	72507	72508	72517	72518	72519	72520	72526	72538	72540	72542	72551	72556	72567			
84	0.47	0.40	0.22	0.14	0.39	0.39	0.12	0.33	0.29	0.27	0.26	0.27	0.23	0.54	0.25	0.27	0.12	0.10	0.01	0.00	0.30	0.29	0.00	0.32	0.28	0.20	0.31	0.00	0.27	0.60	0.34	0.19	0.18	0.01	0.29	0.21	0.18	0.00	0.22	0.26	0.26	0.08	0.46			
98	0.00	0.28	0.36	0.32	0.22	0.00	0.31	0.00	0.00	0.00	0.32	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.15	0.23	0.14	0.00	0.43	0.53	0.00	0.29	0.15	0.00	0.26	0.22	0.01	0.25	0.20	0.19	0.11	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00		
112	0.00	0.06	0.00	0.25	0.00	0.06	0.06	0.08	0.00	0.00	0.37	0.03	0.00	0.00	0.08	0.05	0.05	0.06	0.09	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.25	0.34	0.00	0.07	3.37	0.00	0.31	0.00	0.00	0.65	2.15	0.24	0.13	0.00	0.47	2.27	
120	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.03	0.26	0.00	0.20	0.04	0.01	0.00	0.26	0.08	0.09	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.03	2.28	0.16	0.10	0.12	0.02	0.14	0.10	0.09	0.48	0.12	0.04	0.00	0.39	0.03	10.02	8.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
127	0.22	0.23	0.00	0.06	0.07	0.46	0.15	0.22	0.11	0.00	0.10	0.40	0.26	0.11	0.03	0.00	0.20	0.00	0.06	0.02	0.23	2.47	0.00	0.10	0.07	0.16	0.14	0.40	0.00	0.12	0.26	0.15	0.14	3.20	0.26	0.44	0.36	0.59	0.73	0.08	0.00	0.22				
134	0.05	0.09	0.32	0.13	0.25	0.16	0.23	0.07	0.08	0.00	0.16	0.07	0.00	0.01	0.00	0.34	0.10	0.00	0.10	0.08	0.09	0.10	0.29	0.23	0.16	0.32	0.12	0.13	0.03	0.05	0.22	1.10	0.09	3.37	0.14	0.23	0.07	0.17	2.05	3.12	0.00	0.03	0.00			
141	0.06	0.14	0.08	0.00	0.02	0.36	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36	0.01	0.00	0.45	0.00	0.00	0.25	0.31	0.06	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.23	0.00	0.00	0.14	4.17	0.00	0.00	0.23	0.28	0.03	0.00	0.12	0.00	0.00	0.29	0.27				
148	0.15	0.16	0.33	0.00	0.00	0.19	0.00	0.07	0.16	0.00	0.04	0.23	0.12	0.00	0.53	0.34	0.12	0.23	0.10	0.01	0.00	0.00	0.24	0.09	0.14	0.00	0.07	0.26	0.15	0.00	0.11	0.11	0.00	0.16	0.15	0.14	0.00	0.00	0.26	0.13	0.12	0.29	0.00			
155	0.26	0.29	0.00	0.15	0.08	0.26	0.06	0.06	0.00	0.02	0.25	0.03	0.09	0.00	0.73	0.05	0.25	0.07	0.14	0.17	0.07	0.06	0.05	0.13	0.29	0.08	0.11	0.09	0.00	0.28	0.42	0.40	0.25	0.05	0.00	0.14	0.14	0.33	0.00	0.45	0.31	0.20	6.51	0.00		
162	0.50	0.14	0.13	0.47	0.00	0.27	0.21	0.15	0.19	0.00	0.16	0.27	0.38	0.44	1.06	0.28	0.18	0.09	0.27	0.31	0.00	0.25	0.13	0.20	0.27	0.20	0.00	0.26	0.06	0.06	0.54	0.33	0.08	0.25	0.14	0.58	0.00	0.21	0.45	2.08	0.24	0.13	0.00			
169	0.21	0.10	1.51	0.29	0.07	0.26	0.16	0.19	0.22	0.09	0.16	0.25	0.17	0.26	0.34	0.21	0.33	0.39	0.00	0.50	0.08	0.29	0.19	0.00	0.20	0.00	0.21	0.31	0.49	0.56	0.24	4.30	0.19	0.34	0.08	0.30	0.62	0.13	0.19	0.44	2.29	0.30	0.28	0.00		
176	2.02	0.72	0.47	0.43	0.10	0.76	0.39	0.42	2.33	0.14	0.31	0.32	0.16	0.28	1.90	0.00	0.29	0.34	0.34	1.37	0.12	1.91	0.25	0.23	0.18	0.38	1.52	0.61	0.76	1.03	0.61	0.14	0.63	0.37	0.37	0.24	0.38	0.80	0.15	0.27	0.17	2.48	0.32	0.00		
183	0.28	1.98	1.39	3.12	0.19	0.15	0.79	0.16	0.55	2.21	0.43	0.09	0.43	0.41	0.47	0.00	0.14	2.76	0.25	0.44	0.88	0.47	0.21	0.00	0.25	0.60	0.33	0.00	1.02	3.45	0.00	0.30	0.00	0.25	0.26	0.30	0.17	0.26	0.37	0.26	0.00	0.80	4.73	0.00		
190	0.28	0.52	0.00	0.21	0.33	0.93	2.09	0.00	1.69	0.79	0.73	0.00	1.53	1.32	1.37	0.39	0.30	0.83	0.50	1.48	0.30	0.43	0.63	0.62	0.31	3.49	1.38	0.79	0.24	0.03	0.41	0.40	1.45	1.17	0.26	0.32	3.79	6.60	5.47	0.28	0.37	2.03	2.12	0.00		
197	0.31	1.57	0.32	3.94	2.71	1.76	0.20	0.39	2.07	3.46	1.84	0.51	0.80	0.46	2.70	0.29	0.31																													
204	0.45	5.25	0.29	2.08	2.55	0.65	0.32	0.00	0.65	13.58	0.26	0.65	3.27	0.32				7.39	1.32	0.05	7.07	0.38	5.04	5.71	0.46	5.48	0.84	2.35	1.39	0.00	5.51	8.00	0.92	1.77	13.98	0.52	0.35	16.57	0.95	0.23	0.31	0.14	5.79	0.00		
211	0.55	0.68	0.30	1.36	1.17	2.16	3.30	0.13	2.31	0.52	0.25	2.83	0.49	1.17	1.34	0.42	0.50																													
224	1.60	0.56	0.49	0.43	0.69	1.15	0.29	2.45	2.34	2.36	0.46	5.74	3.50	0.64	10.00	1.01	0.24	6.26	10.00	0.30	0.51	0.82	0.51	6.34	0.34	3.15	3.21	0.36	0.51	0.58	0.74	2.80	2.42	4.65	6.74	5.31	0.87	3.25	1.54	0.88	0.02	0.00	10.00			
238	0.70	4.42	1.90	0.49	1.94	0.86	1.16	0.40	1.14	5.23	1.30	1.77	0.43	0.59	0.99	2.84	0.73	0.43	6.42	4.07	1.55	0.35	2.12	3.86	0.45	2.81	1.77	0.78	1.62	3.60	3.85	1.74	1.18	2.12	4.20	0.62	0.50	2.11	1.42	0.43	2.28	1.77	1.56			
252	8.11	6.27	1.56	9.07	2.38	0.30	4.27	0.36	0.36	0.74	0.56	1.63	2.80	5.01	0.67	1.34	2.64	0.82	2.02	1.73	2.24	6.13	2.66	0.98	6.83	6.13	1.06	0.67	1.27	0.99	1.75	1.54	0.40	1.19	2.99	0.69	8.22	3.99	0.75	0.39	10.19	6.12	1.47			
259	0.82	0.85	0.80	0.80	0.85	2.20	1.04	0.62	7.69	4.75	1.88	3.64	0.97	0.64	1.31	0.93	2.76	0.25	0.29	4.43	2.49	0.91	4.42	1.80	1.52	0.79	1.82	1.50	2.05	2.68	1.31	6.76	0.03	8.60	6.55	0.69	0.80	4.75	2.19	5.47	2.66	5.08	5.13			
267	1.24	1.29	1.06	1.59	0.87	2.52	1.93	1.99	1.38	0.19	2.16	0.07	2.08	1.51	2.05	0.18	2.13	0.13	1.55	3.74	0.31	3.33	0.64	1.32	2.34	1.67	0.24	1.62	0.95	0.82	1.99	0.77	2.01	0.13	0.92	8.22	1.78	0.24	0.34	4.23	3.08	2.71	3.54			
274	2.53	4.50	2.10	3.98	1.92	1.95	4.28	0.36	1.05	2.05	0.58	1.86	1.03	2.40	2.23	0.18	2.05	0.22	0.21	3.86	1.24	2.70	2.51	5.68	11.67	0.88	1.55	0.61	2.96	1.91	2.86	1.97	0.82	0.90	16.24	2.20	1.56	1.82	2.03	3.22	2.94	3.18	3.55			
281	1.71	1.34	1.41	2.06	1.46	2.25	2.09	0.00	2.10	3.16	1.12	2.47	1.68	2.84	2.69	0.04	3.00	0.19	0.30	3.36	2.29	3.28	3.44	4.93	3.82	2.34	6.95	1.56	3.86	2.21	3.37	2.97	2.51	2.10	4.75	2.55	2.42	3.69	6.11	3.28	4.37	2.91				
288	1.71	1.38	1.70	2.54	2.43	1.90	2.53	0.07	2.80	3.18	2.17	2.68	2.20	3.57	3.09	0.21	3.31	0.25	1.09	4.65	2.43	4.40	2.29	4.78	4.58	3.08	3.77	2.62	4.68	2.60	2.89	3.86	2.77	1.88	3.48	2.59	3.27	4.67	3.27	2.87	3.07	4.03	4.47			
301	1.56	3.66	2.06	3.64	2.73	2.45	3.16	0.21	2.06	4.11	3.02	2.70	1.96	2.96	2.35	0.20	2.54																													
309	2.85	3.17	2.33	4.00	4.21	2.85	3.21	0.40	2.84	3.20	3.81	2.87	2.53	4.10																																
Total général	1.06	1.40	0.78	1.54	1.03	1.01	1.21	0.34	1.28	1.88	0.94	1.16	1.10	1.12	1.46	0.39	0.91	0.92	1.09	1.35	1.19	1.78	1.51	1.87	1.80	1.62	1.35	0.90	1.44	1.65	1.35	2.34	0.98	1.46	2.87	1.24	1.86	2.59	1.49	1.30	1.50	1.50	2.44			

En bleu, les agnelles ++ au locus L. En orange, les agnelles L/+. Les dosages surlignés sont supérieurs à 0,6 ng/µl de progestérone.

Je me suis également intéressée à l'effet de l'allaitement artificiel sur l'évolution du poids des agnelles. Au moment des naissances, nous avons fait le choix pour les portées triples et plus de ne pas laisser tous les agneaux sous leur mère. Les agnelles les plus lourdes sont restées avec leur mère afin de garder des portées homogènes. Les agnelles les plus légères ainsi que les mâles ont été mis à l'allaitement artificiel. L'allaitement artificiel consiste à remplacer le lait de la mère par un aliment commercial distribué par un nourrisseur robotisé appelé « louve ». Comme nous pouvons le voir dans la Figure 74, jusqu'à 4 mois les agnelles nées multiples restent plus légères à l'allaitement artificiel que celles, nées simples ou multiples, restées sous la mère. Cependant, une fois la phase de transition alimentaire terminée, passant d'une ration essentiellement lactée à une alimentation à base de fourrage et concentré, la différence n'est plus significative. Aucun effet du génotype sur la croissance en fonction du mode d'allaitement n'a pu être mis en évidence.

### C. Mise en place de la puberté

Chez les agnelles Lacaune, la puberté en saison est atteinte vers l'âge de 6 mois. J'ai mesuré la concentration circulante en progestérone (P4) à partir des prélèvements sériés de plasma entre 2 et 8 mois d'âge, afin de couvrir la période de mise en place de la puberté. J'ai considéré qu'un événement d'ovulation a lieu lorsque la concentration en P4 dépasse le seuil de 0,5-0,6 ng/ml. Les différents profils de P4 en fonction du génotype au locus *FecL* sont représentés dans la Figure 75. Les agnelles *+/+* ont une concentration plasmatique de P4 stable et très inférieure au seuil jusqu'à l'âge de 5 mois. La moyenne d'âge à la première ovulation, approchée par le dépassement du seuil, est de  $6,2 \pm 0,6$  mois et les agnelles *+/+* démarrent un rythme cyclique d'ovulation (Tableau 26). Le profil en P4 des agnelles *L/+* est différent. On observe rapidement une augmentation de la concentration plasmatique de P4 entre 3 et 4 mois qui dépasse le seuil de 0,6 ng/ml une première fois, puis une seconde fois au même âge que les agnelles *+/+* vers 5 mois et demi. La moyenne d'âge de la première ovulation pour les agnelles *L/+* est de  $5,2 \pm 1,3$  mois et cet âge à la puberté est significativement plus précoce d'un mois que les agnelles *+/+* ( $p > 0,001$ ).

En observant plus précisément le Tableau 26, on distingue deux groupes parmi les agnelles *L/+*. Le premier représente les agnelles « précoces », qui au vu de leur profil de P4, doivent présenter des événements d'ovulation précoces. Le second groupe, semble se comporter de façon similaire aux agnelles *+/+*. En réalisant cette distinction représentée sur la Figure 76, les agnelles *L/+* « précoces » commencent leur puberté dès l'âge de  $3,9 \pm 0,3$  mois et nous pouvons observer des cycles œstriens réguliers par la suite (Tableau 26). Les autres agnelles *L/+* commencent leur puberté à l'âge de  $5,9 \pm 0,5$  mois soit environ 3 semaines avant les *+/+* (Figure 76).

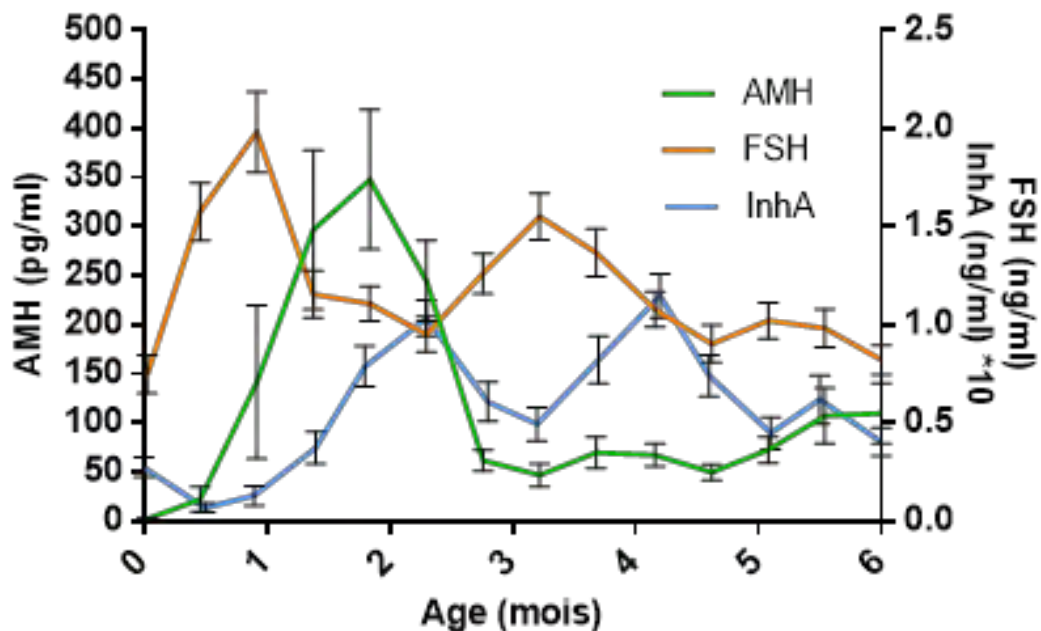


Figure 77: Courbes générales de l'AMH et de la FSH entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune.

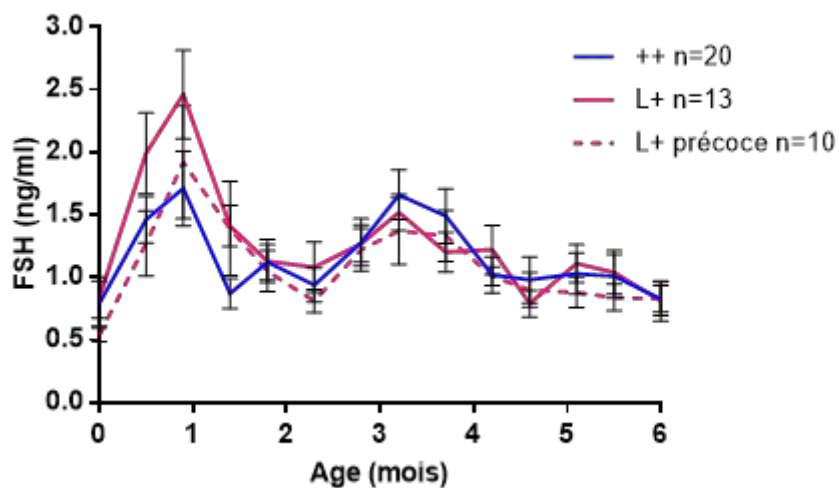


Figure 78: Évolution de la concentration plasmatique de FSH entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+

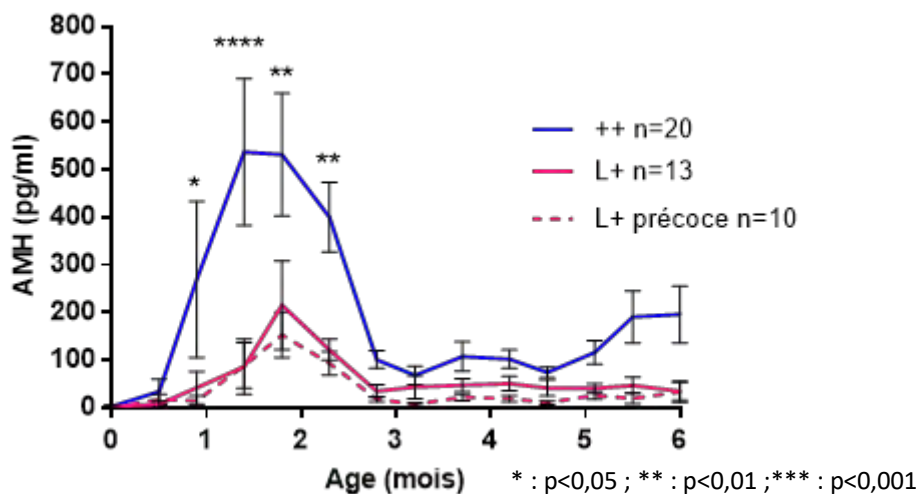


Figure 79: Évolution de la concentration plasmatique d'AMH entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+

On remarque qu'aucune agnelle  $+/+$  n'est précoce, alors que la moitié des  $L/+$  le sont (précoces :  $n=10$  ; normales :  $n=13$  ; Tableau 26). Aucune des agnelles n'est pleine sœur parmi les agnelles précoces, certaines sont cependant demi-sœurs par le père.

Pendant la période de mise en place de la puberté, j'ai réalisé le dosage d'autres hormones, FSH, AMH et inhibine A (PE 15). Ces choix ont été dictés par plusieurs éléments, comme leur importance dans le fonctionnement ovarien, des données de la littérature assez limitées pour leur profil de sécrétion au cours des premiers mois de vie chez les agnelles, et des éléments laissant penser que l'inhibine A est la cible directe de la mutation *FecL<sup>L</sup>* (Drouilhet et al., 2013). Indépendamment du génotype, le profil de sécrétion de la FSH dans la circulation sanguine montre une concentration de 0,5 à 1 ng/ml à la naissance, suivie de deux augmentations sous forme d'un premier pic de sécrétion atteignant 1,5-2 g/ml à 1 mois puis un second à 3 mois environ. La concentration revient à son niveau « naissance » entre et après ces événements (Figure 77).

Concernant l'AMH, son profil de sécrétion pendant cette période est différent. Indétectable à la naissance, l'AMH voit sa concentration augmenter pour atteindre un maximum à 300-350 pg/ml en moyenne vers l'âge de 2 mois. Cette concentration redescend ensuite pour se stabiliser entre 50 et 100 pg/ml. De façon marquante le moment de ce pic d'AMH se situe entre les deux pics de FSH (Figure 77). L'inhibine A, après une légère diminution après la naissance, montre, comme la FSH, un profil avec deux pics de sécrétion atteignant 10 à 15 ng/ml pendant cette période de mise en place de la puberté. Dans les deux cas, ces pics sont décalés de quelques semaines suivant les pics de FSH (Figure 77).

Si l'on détaille les profils de ces trois hormones en fonction du génotype au locus *FecL* et en tenant compte de la précocité de la puberté observée chez certaines agnelles  $L/+$ , il apparaît que le profil de FSH n'est pas différent entre ces différentes catégories d'agnelles (Figure 78). En revanche, j'ai pu observer un effet significatif de la mutation *FecL<sup>L</sup>* sur les concentrations circulantes d'AMH et d'inhibine A (Figure 79 et Figure 80). En effet, les agnelles  $L/+$  ont en moyenne 3 fois moins d'AMH circulante que les agnelles  $+/+$ , en particulier au moment du pic ( $p < 0,001$ , 28-70 jours). La concentration plasmatique reste néanmoins plus basse même après le pic, entre 3 et 6 mois (Figure 79). Au sein du génotype  $L/+$ , le profil d'AMH n'est pas différent quelque soit la précocité à d'ovulation des agnelles.

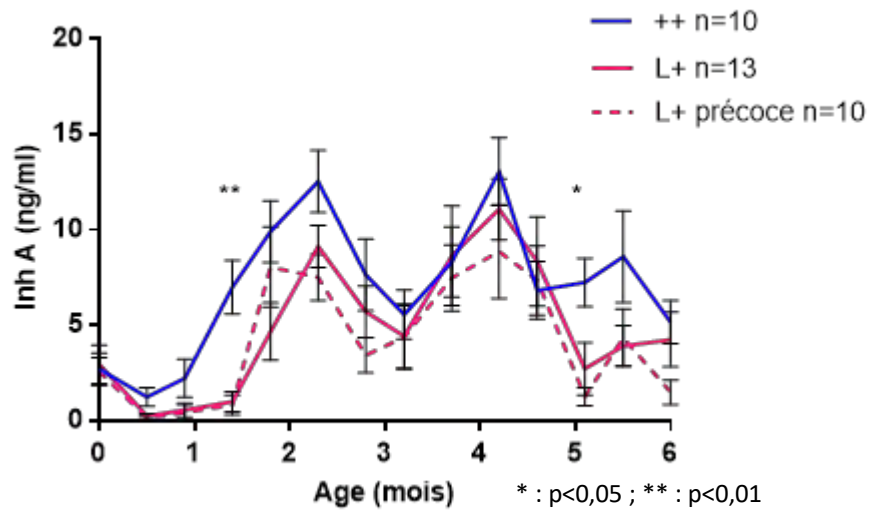


Figure 80: Évolution de la concentration plasmatique d'InhA entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+

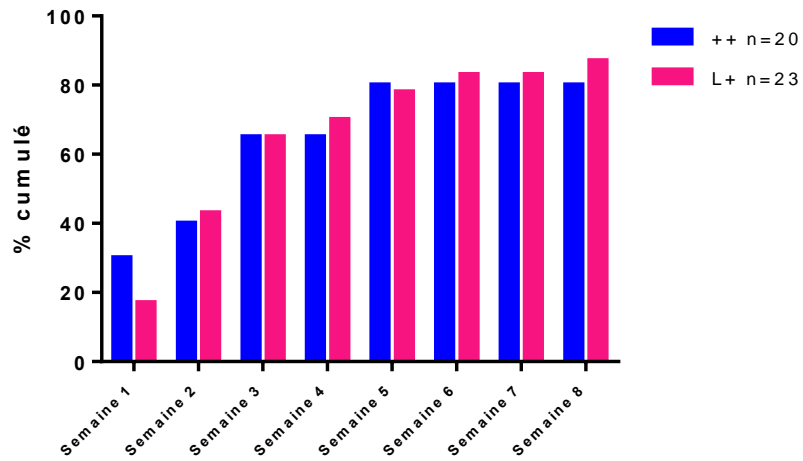


Figure 81: Détection de l'œstrus par les béliers en pourcentage cumulé chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+.

Tableau 27 : Résultats de la mise à la reproduction naturelle des agnelles Lacaune +/+ et L/+.

Génotype	Taux de gestation	Fertilité	Prolificité
++	75%	75%	1.63
L+	100%	95.6%	2.22
	(P<0.05)	(P=0.08)	(P<0.005)



La concentration moyenne d'inhibine A tend à être plus faible chez les agnelles L/+ ( $p=0,06$ ). Cette différence est plus particulièrement marquée au moment de l'augmentation de concentration pour le premier pic et après le second pic (Figure 80 ;  $p < 0,05$ ). Comme pour l'AMH, il n'y a pas de différence de concentration d'inhibine A circulante entre les agnelles L/+ « précoces » et celles qui ne le sont pas.

#### D. Première mise à la reproduction, œstrus, fertilité et prolificité naturelle

Le groupe de 43 agnelles a été placé à la reproduction à l'âge de 8 mois en monte naturelle en présence de deux béliers équipés de harnais marqueurs. Elles étaient réparties en deux lots (indépendamment du génotype au locus *FecL*) et les béliers ont été changés de lot toutes les semaines afin d'éviter les préférences d'interaction. Les mâles ont été mis au contact des femelles pendant 8 semaines afin de couvrir plusieurs cycles œstriens complets pour toutes les brebis. L'enregistrement des marquages des chevauchements, traduisant les moments d'œstrus des brebis, a été réalisé de façon journalière.

Concernant le comportement d'œstrus, aucune influence du génotype n'a été mise en évidence, même au cours de la première semaine ( $p = 0,47$ ). À la fin de la période de lutte, 80% des agnelles +/+ et 87% des agnelles L/+ ont présenté un comportement d'œstrus (Figure 81).

Un mois après les premiers marquages par les béliers, un diagnostic de gestation a été réalisé par échographie (F. Rialand, CRYOPIC, Terre Ovine) et réitéré 2 fois, 15 jours après le premier diagnostic, puis 3 mois après le second. À l'issue du diagnostic, le taux de gestation apparaît significativement supérieur pour les agnelles L/+ comparé aux agnelles +/+ (100% vs 75%,  $p < 0,05$ ; Tableau 27). Après les mises-bas, j'ai pu observer que le taux de fertilité (nombre de brebis ayant mis bas/nombre de brebis mises à la reproduction) pour les L/+ (95,6%) tend à être supérieur à celui des +/+ (75%,  $p=0,08$ , test exact de Fischer ; Tableau 27). La prolificité moyenne est de 1,63 en absence de la mutation *FecL<sup>L</sup>* et de 2,22 chez les agnelles hétérozygotes, soit une augmentation de la taille de portée de +0,59 agneau ( $p < 0,005$  ; Tableau 27).



## II. Effet de *FecL<sup>L</sup>* sur la sensibilité à la PMSG

Comme indiqué dans la partie introductive de cette partie des résultats, je souhaitais en lien avec OVI-TEST évaluer les interactions qui peuvent exister entre l'allèle prolifique *FecL<sup>L</sup>* et l'utilisation de traitements hormonaux pour la synchronisation des cycles œstriens en vue des inséminations animales (IA). En effet, il apparaît que *FecL<sup>L</sup>* est associé à un gain de 11% de fertilité à l'IA des brebis Lacaune du schéma de sélection OVI-TEST (Martin et al. 2014). Le protocole classiquement utilisé en élevage se base sur la synchronisation du cycle œstrien des brebis par une éponge intravaginale de fluogestone (20 mg) pendant 14 jours puis une injection de PMSG (ou eCG) à la dose moyenne de 450 UI au retrait de l'éponge (cette dose peut varier en fonction des élevages de 300 à 600 UI). L'insémination est réalisée 55h après l'injection de PMSG. Dans cette partie concernant l'hypothèse de l'effet de *FecL<sup>L</sup>* sur la sensibilité des brebis à la PMSG, je détaillerai d'une part les résultats obtenus en installation expérimentale INRA et d'autre part, en élevage commercial sur un plus grand nombre d'animaux. Dans les deux cas, j'ai comparé l'absence de traitement avec l'utilisation de deux doses différentes de PMSG, 250 et 450 UI (PE 13).

### A. En élevage expérimental INRA

Pour cette étude, je me suis appuyée sur l'utilisation de 60 brebis Lacaune (43 agnelles du protocole précédent et 17 de leur mère) réparties en 3 lots homogènes (en âge et en génotype au locus *FecL*) que j'ai utilisés dans 3 procédures consécutives différentes, « profils hormonaux », « dénombrement des ovulations » et « insémination animale ».

#### 1) Profils hormonaux de réponse à la PMSG

Afin d'établir les profils endocriniens de réponse au traitement par la PMSG (0, 250 ou 450 UI) pour certaines hormones (LH, FSH, progestérone, AMH et Inhibine A), nous avons réalisé des prises de sang à interval régulier à partir du retrait de l'éponge intravaginale de fluogestone laissée 14 jours. D'abord toutes les 6h durant les 36 premières heures, puis, toutes les 4h durant les 36h suivantes et enfin 1 fois par jour sur les 4 jours suivants (PE 11). Une endoscopie a été réalisée 7 jours après l'injection de PMSG afin de dénombrer le nombre de corps jaunes (PE 14).

Tableau 28 : Concentration de LH pendant la phase folliculaire, moment et intensité du pic lors d'un cycle œstrien synchronisé sans PMSG chez des brebis Lacaune +/- et L/+

Dose	Génotype											
	+/-				L/+							
PMSG (UI)	0 (n=10)		250 (n=9)		450 (n=12)		0 (n=10)		250 (n=11)		450 (n=8)	
Phase	Concentration	Délat du pic (h)	Concentration	Délat du pic (h)	Concentration	Délat du pic (h)	Concentration	Délat du pic (h)	Concentration	Délat du pic (h)	Concentration	Délat du pic (h)
LH (ng/ml)	0.78 ±0.06 <sup>a</sup>	47.1±2.2 <sup>a</sup>	0.91 ±0.18 <sup>a</sup>	40.7 ±3.0 <sup>a</sup>	0.52 ±0.06 <sup>b</sup>	40.7 ±1.3 <sup>b</sup>	0.49 ±0.08 <sup>a§</sup>	41.6 ±2.1	0.27 ±0.05 <sup>b§</sup>	37.4 ±1.2	0.51 ± 0.13 <sup>a</sup>	37.7 ±1.8
Pic	49.99 ±6.51		55.72 ±8.75		49.86 ±4.03		32.36 ±2.74 <sup>§</sup>		35.87 ±3.88 <sup>§</sup>		25.32 ± 6.06 <sup>§</sup>	
FSH (ng/ml)												
Folliculaire (0-24h)	0.84 ±0.10 <sup>a</sup>		0.46 ±0.08 <sup>b</sup>		0.44 ±0.07 <sup>b§</sup>		0.81 ±0.24		0.64 ±0.10 <sup>§</sup>		0.69 ± 0.14 <sup>§</sup>	
Pic	3.15 ±0.44		2.17 ±0.38		2.39 ±0.20		2.95 ±0.37		3.19 ±0.35		3.20 ± 0.57	
a,b : Effet dose au sein d'un même génotype												
§ : Effet génotype au sein d'une même dose												

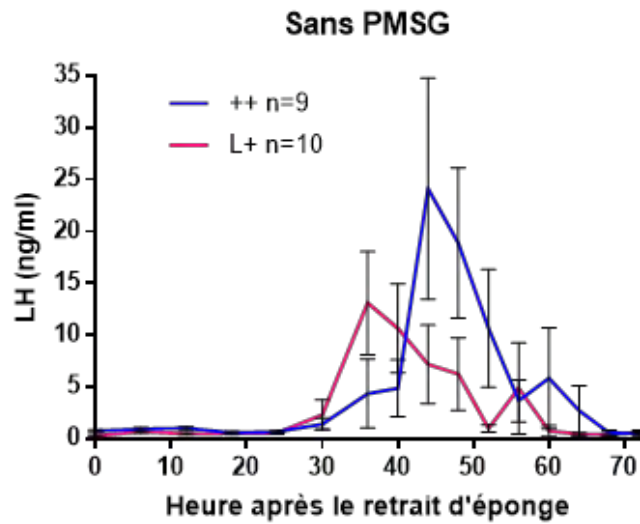


Figure 82: Évolution des concentrations plasmatiques de LH au cours d'un cycle oestrien synchronisé chez les brebis Lacaune.

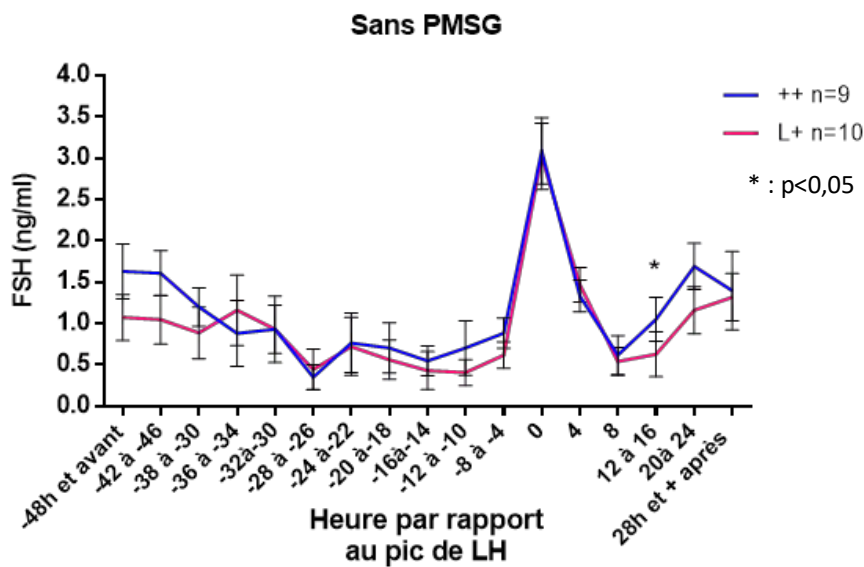


Figure 83: Évolution des concentrations plasmatiques de FSH au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune

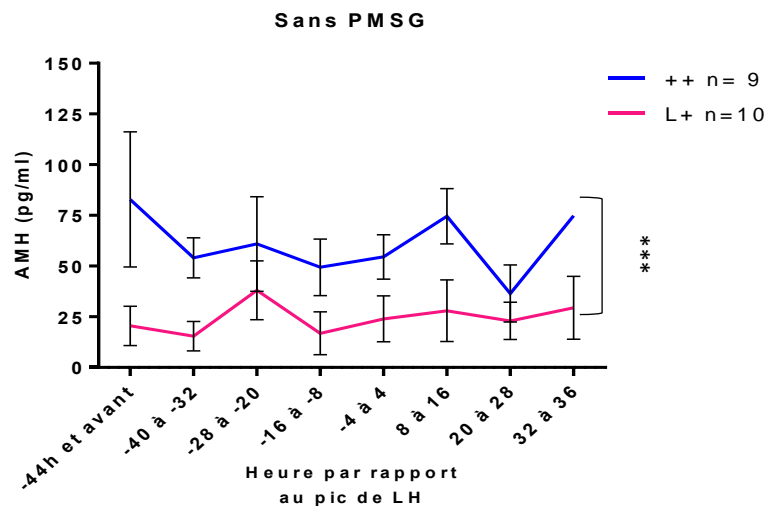


Figure 84: Évolution de la concentration plasmatique d'AMH au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune.

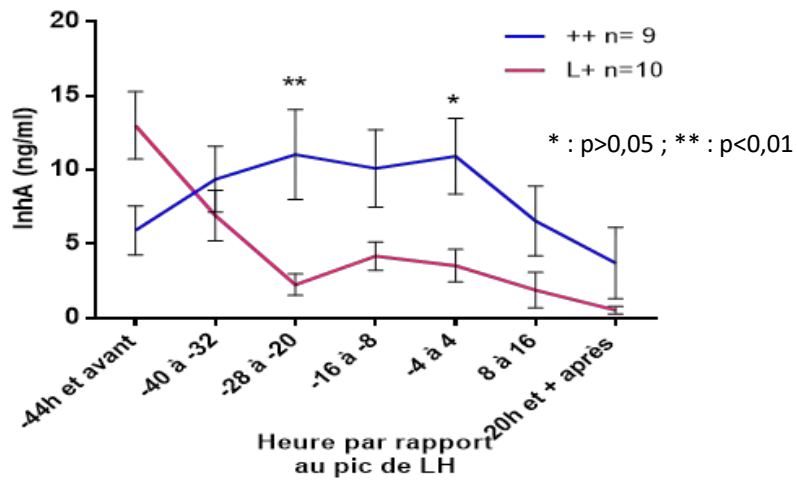


Figure 85: Évolution de la concentration plasmatique de InhA au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune ++ et L/+.

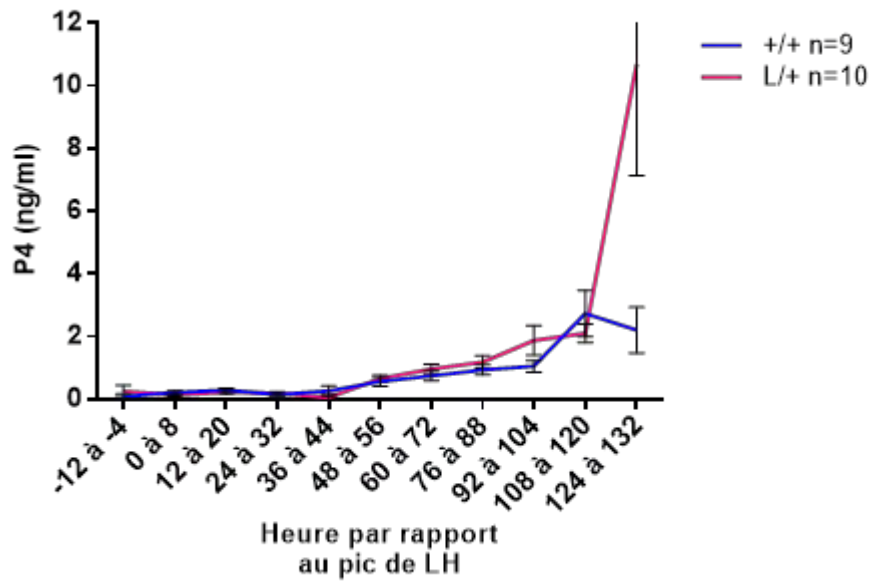


Figure 86 : Évolution de la concentration plasmatique de P4 au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune ++ et L/+.

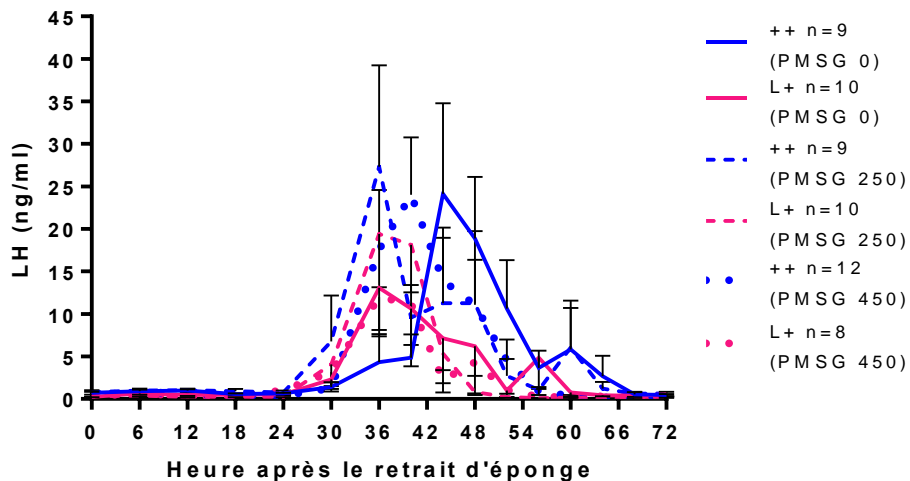


Figure 87 : Effet dose de PMSG sur la LH en fonction des génotypes sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune ++ et L/+.

Dans un premier temps, j'ai réalisé les analyses sur les profils circulants de la LH de façon à déterminer le moment du pic préovulatoire pour chaque brebis. Suite à cette analyse et confortée par les endoscopies, j'ai retiré des analyses suivantes deux brebis n'ayant pas ovulé sur le cycle induit étudié (n° 50040 : +/+, lot 250 UI et n° 72487 : L/+, lot 0 UI).

Je me suis intéressée tout d'abord à l'impact du génotype au locus *FecL* sur le pic préovulatoire de LH en absence de traitement par la PMSG. La concentration basale de LH pendant les 24 premières heures de la phase folliculaire et lors du pic préovulatoire sont significativement plus faibles chez les brebis L/+ (Figure 82 et Tableau 28). Les brebis L/+ tendent par ailleurs à avoir le pic de LH avancé de 5 à 6h par rapport aux brebis +/+ ( $p = 0,08$ ), retrouvant les observations faites avec des brebis L/L (Drouilhet et al., 2010). De façon à faciliter l'interprétation des profils, j'ai ensuite présenté les résultats de dosages plasmatiques de FSH, d'inhibine A et d'AMH calés sur le moment du pic de LH propre à chaque brebis (sous forme d'intervalle).

Les données de concentration circulante de FSH (ANOVA à 2 facteurs, temps et génotype) ne montrent pas d'effet du génotype en absence de PMSG, que ce soit en phase folliculaire ou au moment du pic de LH (Figure 83). Seule la concentration en FSH au moment du pic « rebond » 12 à 16h après le pic de LH apparaît significativement plus élevée chez les brebis +/+ ( $p < 0,05$  ; Figure 83). Dans cette période autour du pic de LH, la concentration en AMH reste assez stable, et elle est significativement inférieure chez les brebis L/+, confirmant les résultats observés avant la puberté (Figure 84). Globalement, la concentration en inhibine A durant cette période du cycle est elle aussi significativement plus faible chez les brebis L/+.

Cependant, les profils de sécrétion apparaissent très différents entre les deux génotypes (Figure 85) au moment du début de la phase folliculaire. Dans les premières 24 heures, l'inhibine A chute chez les brebis L/+, alors qu'elle augmente chez les brebis +/+.

En phase lutéale, la sécrétion de progestérone augmente plus rapidement chez les L/+, mais la concentration moyenne durant la phase lutéale n'est pas différente entre les génotypes (Figure 86). Les concentrations sont très faibles, à la limite de détection par le dosage.

En présence de PMSG, comme on peut le voir sur la Figure 87, l'administration de 250 ou 450 UI a pour conséquence d'avancer le pic de LH des brebis +/+ pour le faire coïncider avec celui des brebis L/+ non traitées aux alentours de 40 heures après le retrait de l'éponge de fluogestone. Par comparaison, le traitement PMSG n'a pas d'influence sur le moment du pic de LH, mais la concentration circulante reste significativement inférieure chez les brebis L/+ (Tableau 28).

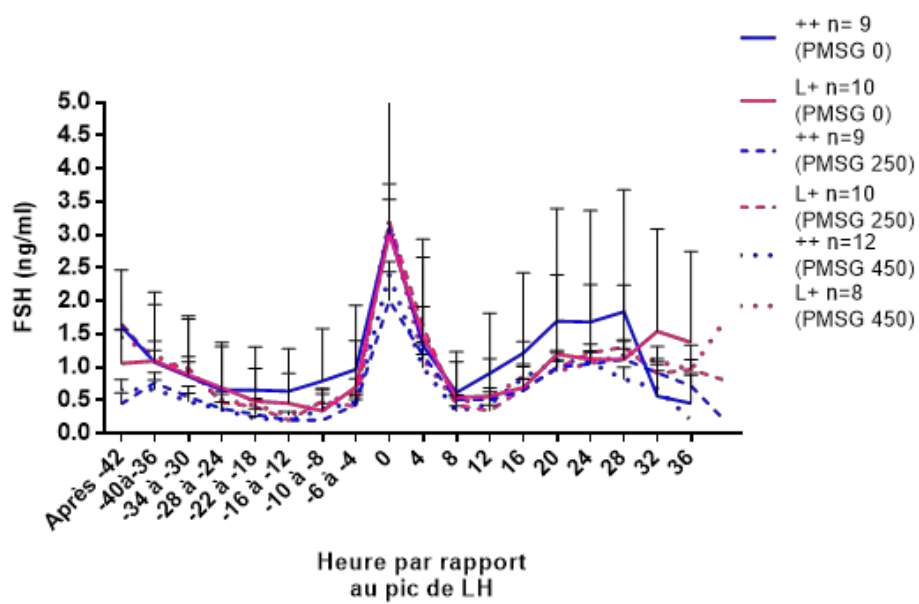


Figure 88 : Effet dose de PMSG sur la FSH en fonction du génotype sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune ++ et L/+.

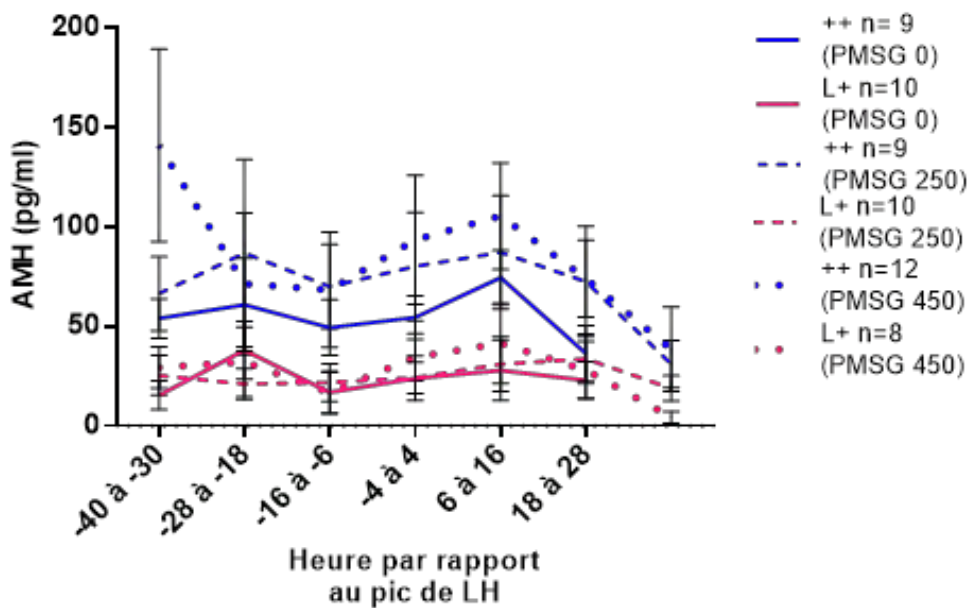


Figure 89 : Effet dose de PMSG sur l'AMH en fonction du génotype sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune ++ et L/+.

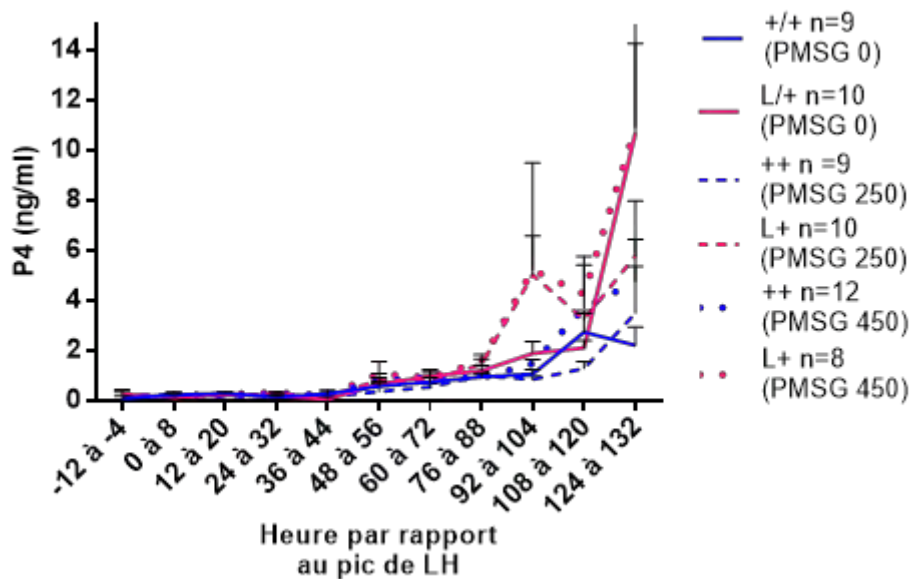


Figure 90 : Effet dose de PMSG sur la P4 en fonction du génotype sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune ++ et L/+.



La concentration moyenne en FSH durant la phase folliculaire est diminuée chez les  $+/+$  dès l'utilisation d'une demi-dose de PMSG et il y a un retard de la décharge de FSH pour une dose à 450 UI (Figure 88). Le profil en FSH des brebis  $L/+$  n'est pas modifié par l'utilisation de PMSG, mais la concentration moyenne durant la phase folliculaire a tendance à être diminuée.

La concentration en AMH est stable au cours du cycle avec une légère chute 30h après le pic de LH (Figure 89). Le profil et le niveau d'AMH ne sont pas modifiés, quelle que soit la dose de PMSG utilisée par rapport à l'absence de PMSG. Le niveau d'AMH est resté stable pendant toute la durée du cycle. Le niveau est cependant plus élevé chez les brebis  $+/+$  que les  $L/+$  quelle que soit la dose de PMSG, de façon similaire à ce qui avait été observé avec des brebis  $L/L$  (Drouilhet et al., 2010).

Il semblerait que les profils hormonaux des brebis hétérozygotes au locus *FecL* ne soient pas modifiés par l'utilisation de PMSG, quelle que soit la dose. Au sein d'une même dose de PMSG, on peut retrouver un effet du génotype au locus *FecL*. Par exemple, pour une demi-dose, la concentration en LH, pendant la phase folliculaire, et au moment du pic, est significativement plus faible parmi les  $L/+$ . La même observation est valable pour la concentration en LH au moment du pic pour une dose à 450 UI. On retrouve un effet de *FecL<sup>L</sup>* sur la concentration en FSH pendant la phase folliculaire plus élevée chez les  $L/+$ .

Durant la phase folliculaire et le début de la phase lutéale, il n'y a pas d'effet de la dose de PMSG sur la concentration en P4. De la même façon, aucun effet du génotype n'est observable (Figure 90).

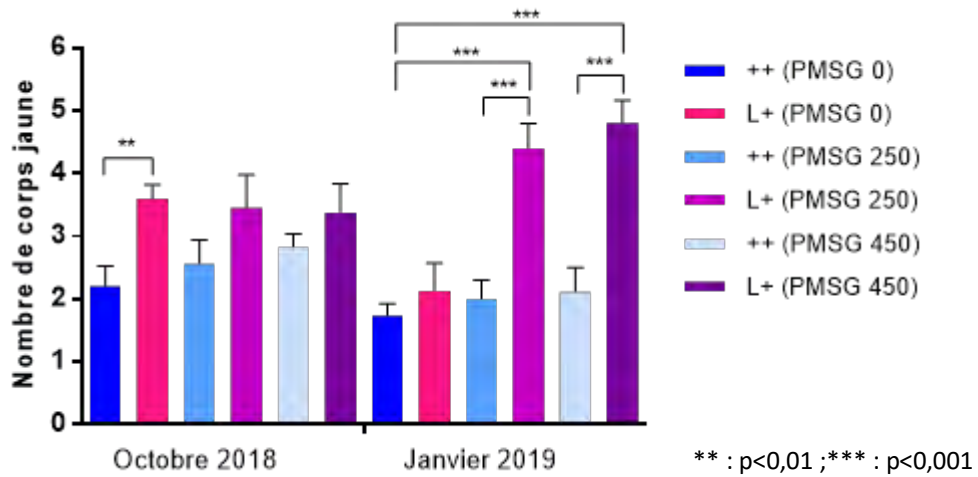


Figure 91: Effet de différentes doses de PMSG sur le nombre d'ovulations chez des brebis Lacaune +/+ et L/+.

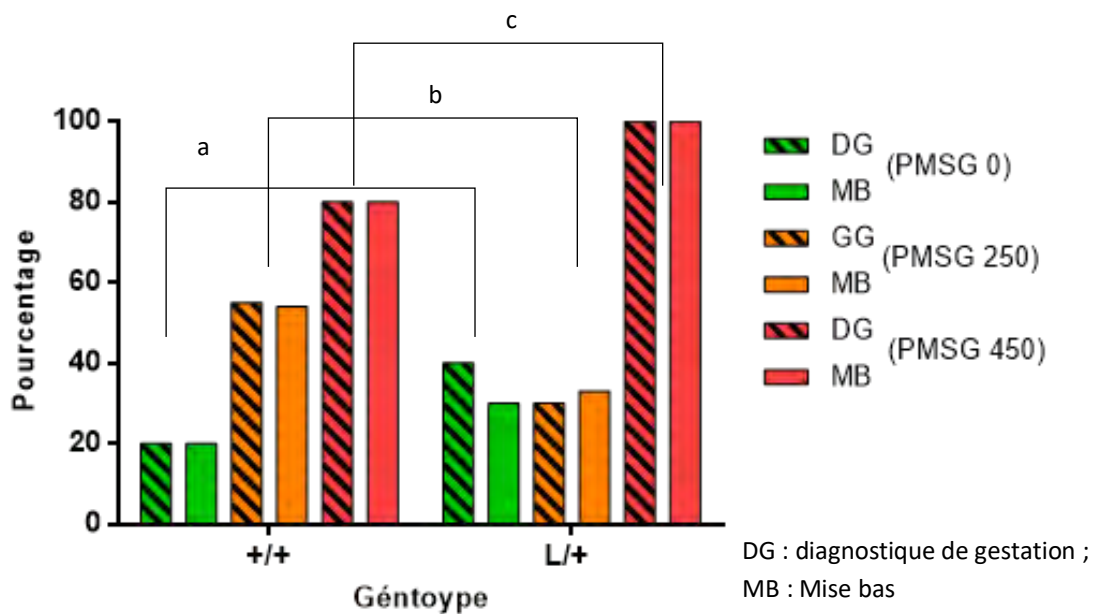


Figure 92 : Diagnostic de gestation et fertilité en installation expérimentale chez des brebis Lacaune +/+ et L/+.

## 2) Dénombrement des ovulations

Pour évaluer l'impact de la PMSG sur le nombre d'ovulations en lien avec le génotype au locus *Fecl*, nous avons réalisé deux séries d'endoscopie pour visualiser les corps jaunes, 7 jours après le retrait de l'éponge intravaginale de fluogestone (Figure 91). La première série a été réalisée suite aux prélèvements sanguins du protocole précédent au mois d'octobre 2018 (en période d'activité sexuelle saisonnière) et la seconde série, 3 mois plus tard en janvier 2019 (début de l'anœstrus saisonnier, sans prélèvements sanguins préalables). Entre les deux séries, j'ai fait « tourner » les traitements : les brebis sans traitement de la première série ont reçu 250 UI de PMSG, celles avec 250 UI ont reçu 450 UI et celles avec 450 UI n'ont pas été traitées à la PMSG.

Pour les endoscopies d'octobre, en période d'activité cyclique saisonnière, 95% des brebis sans PMSG ont ovulé (19 sur 20). Sans traitement, les brebis *L/+* ont présenté significativement plus de corps jaunes que les brebis *+/+* (3,6 vs 2,2  $p < 0,01$ ). L'utilisation de 450 UI de PMSG tend à augmenter le nombre de corps jaunes des brebis *+/+* passant de 2,2 à 2,8 ( $p = 0,1$  ; test-T de Student). À contrario, les brebis *L/+* ne sont pas sensibles à l'injection de PMSG à cette période de l'année (Figure 91).

En janvier, qui pourrait correspondre au début de la période d'anœstrus, j'ai pu encore observer 95% de brebis ayant ovulé sans traitement PMSG. Par contre, je n'ai pas observé d'effet de la mutation *Fecl<sup>L</sup>* sur le nombre de corps jaunes en absence de PMSG. La tendance observée en octobre pour l'effet de la PMSG à 450 UI pour les brebis *+/+*, ne se confirme pas en janvier. Ce sont en fait les brebis *L/+* qui montrent une sensibilité forte aux deux doses de PMSG utilisées avec deux fois plus de corps jaunes que sans traitement ( $p < 0,001$ , Figure 91).

## 3) Fertilité à l'insémination animale

J'ai réalisé un troisième protocole de synchronisation sur les mêmes lots de brebis, au cours du mois de mars 2019. Une nouvelle fois, j'ai fait « tourner » les traitements. Les brebis sans traitement de la deuxième série ont reçu 250 UI de PMSG, celles avec 250 UI ont reçu 450 UI et celles avec 450 UI n'ont pas été traitées à la PMSG. Toutes les brebis ont été inséminées artificiellement 55 heures après le retrait de l'éponge et l'administration des diverses doses de PMSG. Nous n'avons pas réalisé d'endoscopie afin de limiter le risque de perte foétale. Un diagnostic de gestation par échographie a été réalisé à deux mois de gestation (Figure 92).

Tableau 29 : Effet dose de PMSG sur la prolificité en installation expérimentale chez des brebis Lacaune +/+ et L/+.

	Dose PMSG (UI)	Prolificité	Prolificité moyenne par génotype
++	0	1,50	1,625
	250	1,50	
	450	1,75	
L+	0	2,00	2,375
	250	2,00	
	450	2,60	
<b>Total</b>		2,00	

Tableau 30 : Effet de la dose de PMSG sur la fertilité et la prolificité à l'insémination animale (IA) dans l'élevage A pour des brebis Lacaune +/+ et L/+.

Génotype et dose de PMSG	IA	Mise-bas	Agneaux nés	Fertilité (%)	Prolificité
L/+ à 0 UI	46	21	49	46,7	2,33
L/+ à 250 UI	56	39	92	70,9	2,36
+/+ à 250 UI	77	42	74	54,5	1,76
+/+ à 450 UI	72	52	96	72,2	1,85

Globalement, le taux de gestation est amélioré significativement par l'utilisation de la PMSG, mais le génotype n'influe pas sur ce paramètre. Sans PMSG, les brebis *+/+* présentent un taux de gestation de seulement 20%. Ce taux passe à 80% en présence de 450 UI de PMSG. La même observation est faite pour les brebis *L/+* (de 40 à 100%). La fertilité à la mise bas en septembre 2019 donne sensiblement les mêmes résultats, un effet significatif de la PMSG mais pas d'effet du génotype (Figure 92). On peut remarquer qu'une brebis *+/+* non traitée a mis bas sans diagnostic positif de gestation, et inversement, qu'une brebis *L/+* à 250 UI de PMSG n'a pas mis bas alors qu'elle était gestante, correspondant à une perte embryonnaire.

En terme de prolificité, quelle que soit la dose de PMSG, de 0 à 450 UI, les brebis *L/+* présentent une prolificité significativement plus élevée que les brebis *+/+* (Tableau 29 ;  $p < 0,01$ ). De plus, pour chaque génotype, la PMSG à 450 UI augmente la prolificité, alors qu'à la dose de 250 UI elle n'a pas d'effet sur ce paramètre (0 vs 450 UI : *+/+*  $p = 0,54$  ; *L/+*  $p = 0,37$ ).

Finalement, sur cette expérimentation utilisant 60 brebis Lacaune mimant les pratiques d'élevage, nous avons obtenu une fertilité globale de 55% pour une prolificité moyenne de 2 agneaux par mise-bas, le protocole classique utilisant 450 UI de PMSG apparaissant le plus efficace.

## B. En élevage commercial

Sur le modèle des doses de PMSG testées expérimentalement, nous avons proposé à OVI-TEST de réaliser les mêmes tests en condition d'élevage sur un plus grand nombre d'animaux porteurs et non porteurs de la mutation *FecL<sup>L</sup>*. Ces essais ne concernent que des données de fertilité à l'IA et de prolificité selon la procédure classique d'IA en contre-saison (IA de février). Nous avons tenté d'inclure plusieurs élevages du noyau de sélection OVI-TEST à ces essais. Cependant, un seul élevage (Élevage A) a accepté de constituer un lot sans utilisation de la PMSG et uniquement pour le génotype *L/+* au locus *FecL*, par anticipation d'une fertilité trop faible et d'une prolificité diminuée pouvant impacter les revenus. Un second objectif étant la réduction de l'utilisation de la PMSG, un élevage (Élevage B) a testé l'utilisation de la PMSG à la dose de 250 UI sur les deux génotypes (*+/+*, *L/+*) au locus *FecL*. Cependant pour ces deux élevages, je n'ai pas encore eu accès aux données individuelles, seulement aux données synthétiques, ne permettant pas ainsi de faire les analyses statistiques.

Dans le cas de l'élevage A (Tableau 30), 251 brebis ont été incluses dans l'essai (149 *+/+* et 102 *L/+*). Les brebis *+/+* ont reçu 250 ou 450 UI de PMSG et les brebis *L/+* ont reçu 250 UI de PMSG ou n'ont pas été traitées. Pour l'ensemble du lot, la fertilité à la mise-bas est de 61,3% pour une

Tableau 31 : Effet du génotype au locus *FecL* à la dose de PMSG 250 UI sur la fertilité et la prolificité à l'insémination animale (IA) de brebis Lacaune dans l'élevage B.

Génotype	IA	Mise-bas	Agneaux nés	Fertilité (%)	Prolificité
+/+	40	26	54	65,0	2,08
L/+	36	31	83	86,1	2,68

prolificité de 2,1 agneaux par mise bas en moyenne. La fertilité la plus faible (47%) est observée pour le lot de brebis *L/+* non traitées à la PMSG.

Par contre à 250 UI de PMSG, les brebis *L/+* montre une fertilité (70,9 vs 54,5%) et une prolificité (2,36 vs 1,76) bien supérieures aux brebis *+/+*. Néanmoins, les brebis *+/+* traitées avec 450 UI de PMSG voient leur performance de fertilité égaler celle des brebis *L/+* traitées par 250 UI de PMSG ; la prolificité reste plus faible (1,85).

Dans l'élevage A, la fertilité des 133 brebis traitées à 250 UI de PMSG est de 60,1% pour une prolificité de 2,06. Ces chiffres sont à rapprocher des données de l'élevage B (Tableau 31) ayant traité, à la même période, 76 brebis avec 250 UI de PMSG (40 brebis *+/+* et 36 brebis *L/+*) avec une fertilité de 75,5% et une prolificité de 2,38. Dans cet élevage également, les brebis *L/+* montrent une fertilité (86 vs 65%) et une prolificité (2,68 vs 2,08) plus élevées que les brebis *+/+*.

### III. Discussion – Partie 2

Dans cette partie de la thèse, je me suis particulièrement intéressée aux conséquences de la mutation *FecL<sup>L</sup>* en race Lacaune sur des caractéristiques zootechniques de façon plus large que la prolificité, seule. Les résultats obtenus dans cette partie indiquent que la mutation *FecL<sup>L</sup>* n'a d'impact direct, ni sur le poids de naissance, ni sur la croissance des agnelles porteuses. Par contre, certaines agnelles *L/+* présentent une puberté qui apparait précocement, 2 mois avant l'âge à la puberté, classiquement observée vers 6-7 mois pour cette race. Malgré des profils hormonaux altérés pour l'AMH et l'inhibine A chez les agnelles *L/+*, ceux-ci ne permettent pas d'expliquer cette précocité de la puberté. Nos résultats expérimentaux confirment également une meilleure fertilité et une prolificité accrue des brebis *L/+* suite à une reproduction naturelle, ou dans le cadre de l'insémination animale. Enfin, dans le cadre de l'IA, il apparait que l'absence de traitement par la PMSG réduit fortement la fertilité, même si dans cette condition, les brebis *L/+* semblent plus performantes que les brebis *+/+*. L'utilisation de la dose classique de 450 UI de PMSG, qui avance et synchronise les pics préovulatoires de LH, confirme son efficacité pour des taux élevés de fertilité (> 80%) et de prolificité (> 2). Cependant, la dose de 250 UI montre également une capacité à conserver une fertilité acceptable en limitant l'hyper prolificité ; les brebis *L/+* sont plus sensibles que les brebis *+/+* à cette dose. Ainsi, une proposition de gestion de l'IA en fonction du génotype au locus *FecL* pourrait être faite sur la base d'un traitement des brebis *L/+* avec 250 UI de PMSG et des brebis *+/+* sur la base de 450 UI de PMSG pour obtenir un optimum de fertilité (> 70%) et une prolificité proche de 2,20, tout en réduisant la consommation globale de PMSG.

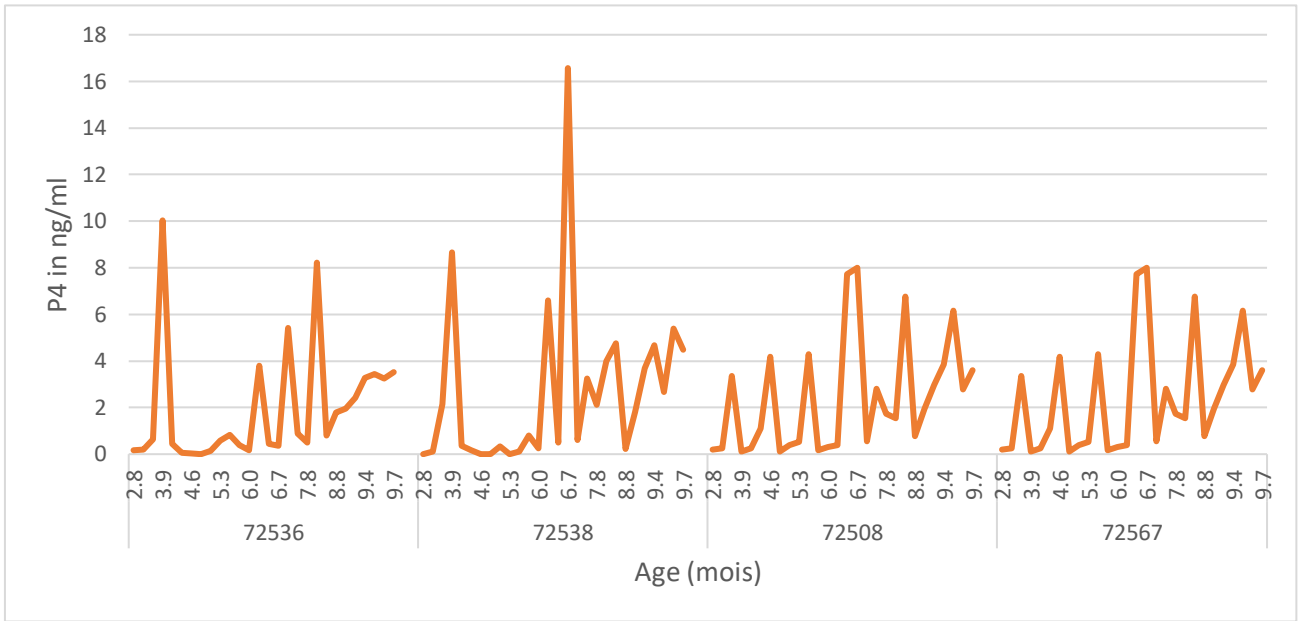


Figure 93 : Profils de la concentration circulante de progestérone (P4) d'agnelles L/+ précoces et cycliques.



## A. Effet de *FecL<sup>L</sup>* sur les caractéristiques zootechniques des brebis

### Lacaune

D'après des études antérieures, nous savons que la mutation *FecL<sup>L</sup>* portée par une brebis Lacaune, impacte négativement sur le poids de naissance et la croissance des agneaux de cette brebis (sans connaissance de leurs propres génotypes) (Martin et al., 2014; Vilment et al., 2018). En effet, dans la population OVI-TEST, la moyenne corrigée donne un poids de naissance des agneaux Lacaune de 4,65 kg ce qui reste proche de celui de nos agneaux nés en installation expérimentale INRA (3,95 kg). En revanche, les agneaux nés de brebis *L/+* sont 182 gr plus légers que ceux nés de mère *+/+* et à 30 jours, après correction pour le mode de naissance (né simple ou multiple), cette différence se confirme, elle est de 300 gr, en moyenne. Cependant, le poids global de la portée reste plus élevé lorsqu'elle est issue d'une mère *L/+*. Ce type d'observation a également été rapporté avec la mutation *FecB<sup>B</sup>* (Kumar et al., 2008). En raison des effectifs déséquilibrés en génotype des mères Lacaune (*+/+* n= 28 ; *L/+* n =6), qui m'ont servi à générer les animaux expérimentaux sur lesquels j'ai travaillé, je n'ai pas pu évaluer cet impact du génotype de la mère possiblement en lien avec les capacités maternelles, avec par exemple la capacité utérine qui pourrait être un facteur limitant à la croissance du fœtus (Davis, 2008; Hanrahan, 1980; Souza et al., 2001), et la quantité et/ou la qualité du lait pour la croissance postnatale.

Quoiqu'il en soit, j'ai bien retrouvé l'impact du mode de naissance sur le poids de naissance de l'agneau et de leur croissance, les agneaux nés multiples étant significativement plus légers que les agneaux nés simples, sans influence de leur propre génotype au locus *FecL*. Une étude similaire en race croisée Garole x Malpura montre, à l'inverse, une influence du génotype de l'agneau au locus *FecB* ; les agneaux *B/+* ou *B/B* sont significativement plus légers que les agneaux *+/+* de la naissance à l'âge de 12 mois (Kumar et al., 2008). En évaluant l'âge à la puberté, par des mesures régulières de la progestérone circulante, j'ai observé que la moitié des agnelles Lacaune *L/+* pouvait être qualifiée de précoce, avec un premier évènement d'ovulation, estimé par des valeurs de progestérone au-dessus du seuil de 0,6 ng/ml, arrivant un peu avant l'âge de 4 mois.

Pour certaines d'entre-elles, une cyclicité régulière s'est mise en place précocement (Figure 93). Cette observation est à rapprocher des quelques données disponibles pour la race D'man dans laquelle la mutation *FecL<sup>L</sup>* ségrège à une fréquence très élevée (75% de brebis porteuses, Ben Jemaa et al., 2018). De façon remarquable, cette race, caractérisée par un âge moyen à la puberté estimé autour de 200 jours, montre également une variabilité importante de l'âge à la puberté avec des



brebis pubères dès 110 jours (Boujenane, 1996). En Lacaune, la sélection du caractère « précocité » est peut-être concomitante à la sélection sur la prolificité. En effet, ces deux caractères ont fait parti des premiers critères de sélection de l'organisme de sélection OVI-TEST (L. Bodin, communication personnelle et [www.lacaune-ovitest.com](http://www.lacaune-ovitest.com)). La question se pose d'un effet direct de la mutation *FecL<sup>L</sup>* sur la puberté précoce. Cependant, toutes les brebis porteuses de *FecL<sup>L</sup>* ne montrent pas de puberté précoce. Alors que *FecL<sup>L</sup>* est associée à une diminution des concentrations circulantes de deux hormones signant le fonctionnement ovarien (AMH et inhibine A), je n'ai pas mis en évidence de lien entre ces profils hormonaux et l'apparition de la puberté. Un autre déterminisme génétique pourrait être recherché pour expliquer cette avance à la puberté. En effet, trois SNPs dans le gène *LEPR* (récepteur de la leptine) sont associés à une variation de l'âge à la première mise bas, en lien avec un retard de puberté (Haldar et al., 2014). Nous pouvons imaginer que ce même gène est également impliqué dans la variation du phénotype de mise en place de la puberté en race Lacaune et pour lequel nous pourrions rechercher des polymorphismes chez nos 10 brebis *L/+* précoces identifiées. Chez la chèvre également des polymorphismes du gène *KISS1R/GPR54* sont associés avec la maturité sexuelle (Ahlawat et al., 2013; Cao et al., 2011; Feng et al., 2009).

Lors de la première mise à la reproduction des agnelles à l'âge de 8 mois, la détection d'œstrus réalisée par l'utilisation de harnais marqueurs portés par des béliers actifs ne montre pas d'effet du génotype au locus *FecL*. Mais, les agnelles *L/+* ont montré une réussite à la reproduction plus élevée que les agnelles *+/+*. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'observation d'agnelles *+/+* tardives en puberté qui n'ont déclenché leur premier cycle oestrien qu'à partir de l'introduction des mâles à environ 250 jours d'âge (Tableau 26). Trois des quatre brebis vides n'avaient pas eu de cyclicité préalable. Lors de cette première mise à la reproduction, la mutation *FecL<sup>L</sup>* a bien exercé son effet inducteur sur la prolificité avec en moyenne +0,5 agneau par mise bas.

Comme observé préalablement sur la population OVI-TEST, l'augmentation de prolificité liée à *FecL<sup>L</sup>* est aussi associée à une augmentation de la fertilité à l'IA de 5 à 11% en fonction du nombre d'agneaux allaités à la mise-bas précédente (Martin et al. 2014). Cette augmentation de fertilité, calculée sur le nombre de mise-bas en fonction du nombre de mise à la reproduction, pourrait être liée en partie, à la capacité prolifique de ces brebis. En effet, elles présentent une probabilité accrue d'obtenir la fécondation d'au moins un des multiples ovocytes ovulés et/ou le développement à terme d'au moins un des multiples embryons en développement. Cependant, comme la pratique de l'IA utilise un traitement par l'hormone gonadotrope PMSG, qui a aussi un effet sur le nombre



d'ovulations, la qualité des ovocytes ovulés, la prolificité et la fertilité (Cole and Miller, 1935; Driancourt et al., 1991; Robinson, 1951; Saumande et al., 1984) nous avons voulu savoir si une interaction peut avoir lieu entre la PMSG et le génotype au locus *FecL*. Les résultats que j'ai obtenus sur 60 brebis en installation expérimentale INRA, ne permettent pas de conclure sur cette interaction. En effet, à la dose de 450 UI de PMSG, la fertilité à l'IA est augmentée, mais aucun effet de la mutation *FecL<sup>L</sup>* n'est observé. Par contre, les résultats obtenus en élevage commercial sur un plus grand nombre de brebis semblent indiquer une meilleure sensibilité des brebis *L/+* à la PMSG en contre-saison. En effet, à la même dose de 250 UI de PMSG les brebis *L/+* ont une fertilité plus élevée que les brebis *+/+*, et il faut traiter ces dernières avec la dose de 450 UI pour obtenir une fertilité équivalente, supérieure à 70%. Cette sensibilité plus importante des brebis *L/+* à la PMSG, je l'ai également observée sur le nombre d'ovulations dénombré par endoscopie (Figure 91), mais uniquement lors du protocole de janvier 2019, la PMSG n'ayant eu aucun effet en octobre 2018. Pourtant, les mesures plasmatiques de LH en octobre 2018 ont montré un effet de la PMSG qui était pourtant active sur le moment d'apparition du pic chez les brebis *+/+*, et s'est traduit par une très légère augmentation du nombre d'ovulations. En présence de la mutation prolifique *FecX<sup>R</sup>* en race Rasa Aragonesa, la PMSG à 480 UI augmente significativement le nombre d'ovulations des brebis *+/+* (2,82 vs. 1,36), mais un traitement à seulement 240 UI de PMSG permet aux brebis *R/+* d'atteindre ce même nombre, indiquant un comportement similaire à la mutation *FecL<sup>L</sup>* (Lahoz et al., 2011). Cette sensibilité augmentée à la PMSG est également observée pour les races ovines prolifiques et non saisonnées, Romanov et Finnoise, indépendamment de mutations à effet majeur (Baril et al., 1993).

Les données que j'ai obtenues sur le délai entre l'injection de PMSG et le moment du pic pré-ovulatoire de LH indiquent que, quelque soit le génotype, en présence de PMSG, le pic de LH a lieu autour de 40 heures après l'injection et le retrait de l'éponge de fluogestone. Cela correspond à l'optimum observé pour le taux de fertilité chez les ovins avec une IA réalisée 55 heures après le retrait (Baril et al., 1993). Ce moment du pic de LH est celui observé pour les brebis *L/+* sans traitement par la PMSG, ce qui pourrait expliquer un taux de fertilité à l'IA non négligeable de ces brebis sans PMSG (40% en expérimentation INRA ; ou 47% en élevage commercial) alors qu'il faut au moins 250 UI de PMSG pour obtenir un taux de fertilité de 50% chez une brebis *+/+*.



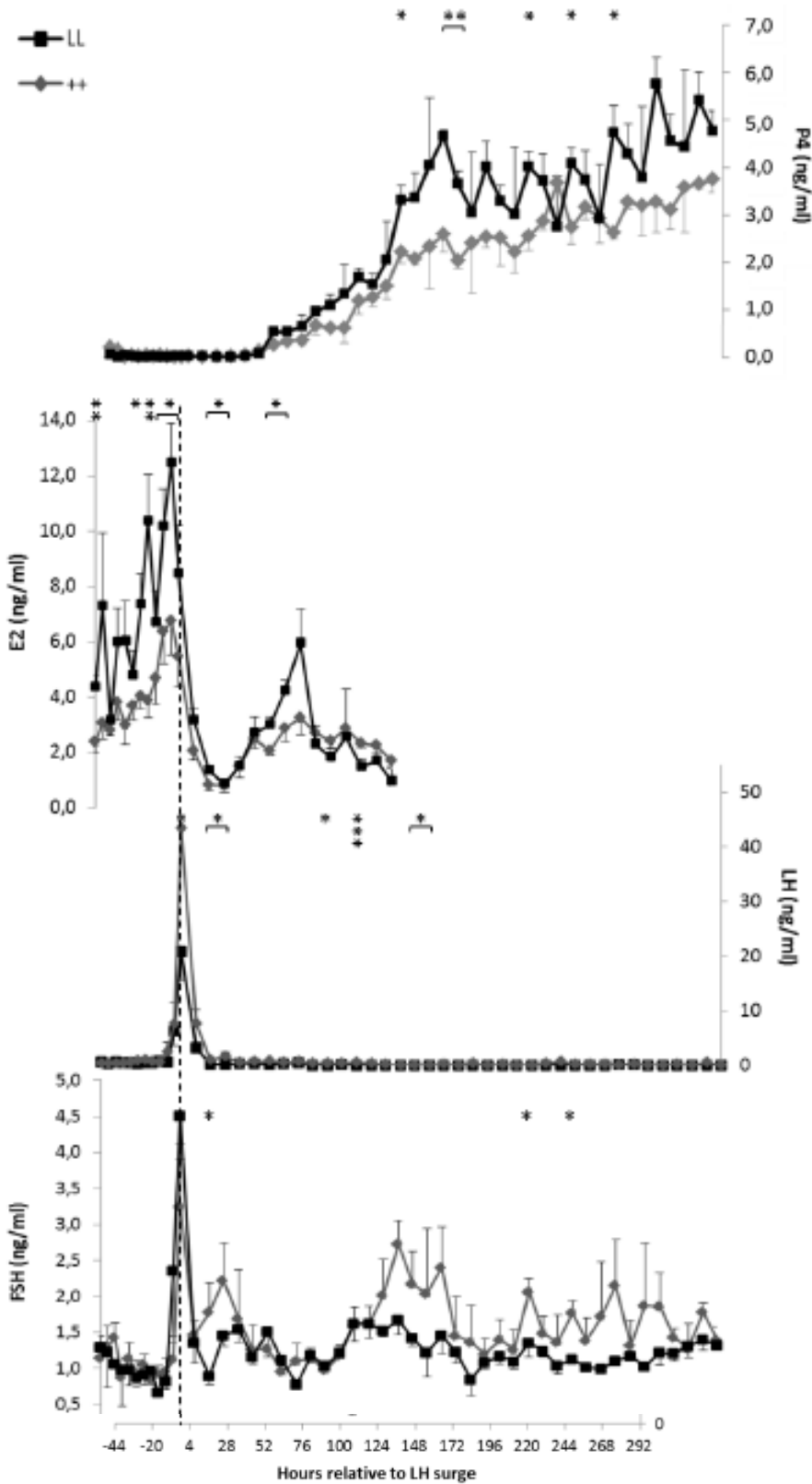


Figure 94: Évolution des concentrations plasmatiques d'E2, LH, FSH et de P4 au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune +/+ et L/L.

(Mansanet, 2013) Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM. Les profils endocriniens moyens des animaux +/+ et L/L ont été positionnés les uns en regard des autres, calés sur le oment du pic de LH (t=0h). Le temps est donné en heures relatives à la survenue du pic de LH. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les moyennes des brebis non porteuses (+/+) et porteuses homozygotes (L/L) de la mutation FeCLL, avec \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

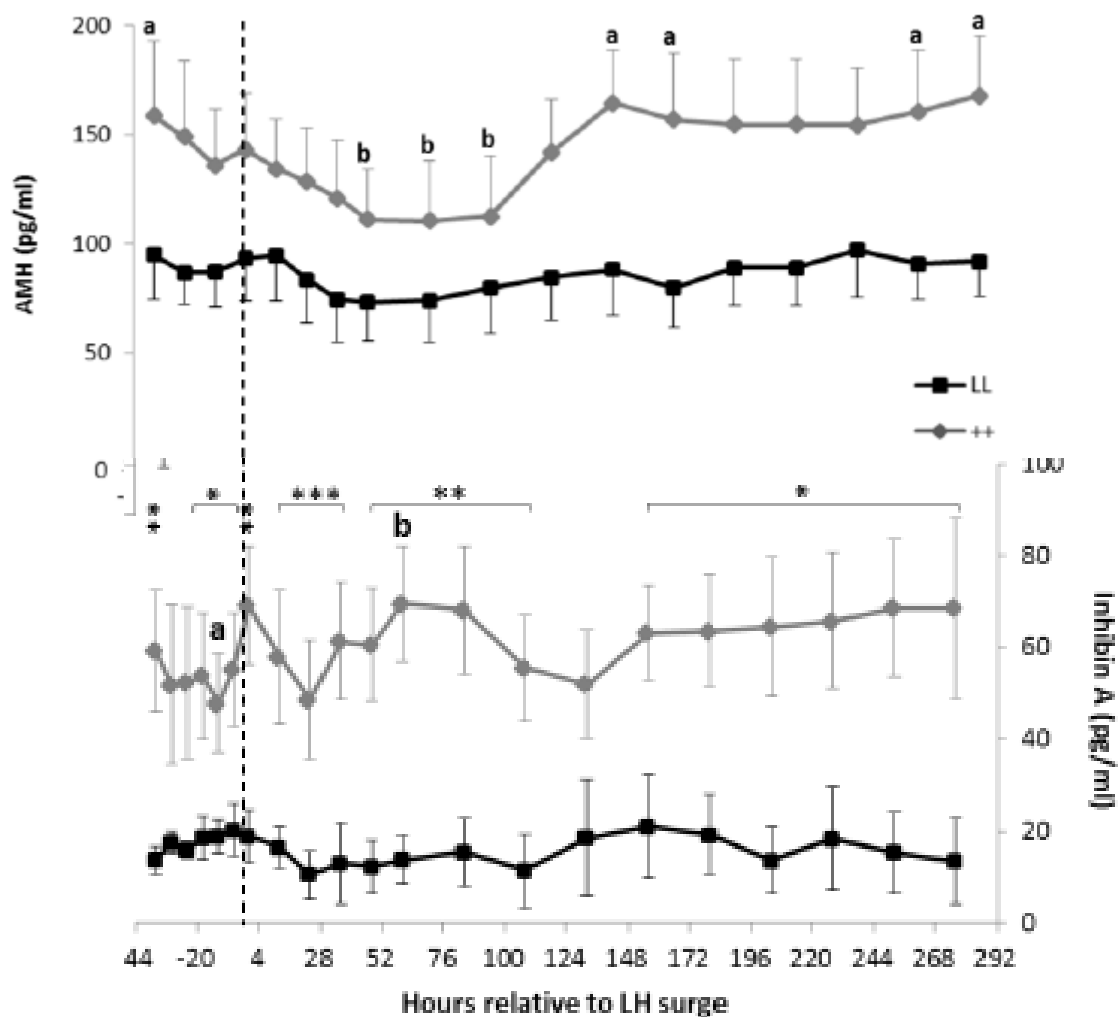


Figure 95: Evolution des concentrations plasmatiques d'AMH au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez des brebis Lacaune +/+ et L/L.

(Mansanet, 2013) Les données représentent les moyennes  $\pm$  SEM. Le profil endocrinien moyen des animaux +/+ et L/L a été calé sur le moment du pic de LH (ligne en pointillés). Le temps est donné en heures relatives à la survenue du pic de LH. Les lettres a et b indiquent des différences significatives pour le profil de l'inhibine A au cours du cycle œstrien d'une brebis +/+, avec  $p < 0,05$ .



## B. Effet de *FecL<sup>L</sup>* sur les profils endocriniens

Lors de deux thèses précédentes, s'attachant à caractériser la mutation *FecL<sup>L</sup>* et ses effets en race Lacaune, un certain nombre de données ont été acquises sur les classes folliculaires dans l'ovaire et sur les profils endocriniens des hormones gonadotropes FSH et LH, de l'œstradiol, de la progestérone, de l'AMH et de l'inhibine A lors d'un cycle œstrien synchronisé par une éponge intravaginale de fluogestone (Drouilhet, 2010; Mansanet, 2013). Ces profils présentés dans la Figure 94, sont comparés entre des brebis homozygotes *L/L* et *+/+* au locus *FecL*.

Au niveau folliculaire, l'augmentation du taux d'ovulation chez les brebis homozygotes *L/L* est associée à une augmentation du nombre de follicules à antrum (dépendants des gonadotropines), d'un diamètre supérieur à 3 mm, ainsi qu'à une réduction de la taille des follicules préovulatoires, plus petits d'1 mm (Drouilhet et al., 2010). Cette réduction du diamètre des follicules préovulatoires avait déjà été observée pour les mutations *FecB* et *FecX* (Driancourt et al., 1985; Fabre et al., 2006; Montgomery et al., 1992, 2001). Dans les follicules *L/L*, l'augmentation de l'activité aromatasase (évaluée par le rapport des concentrations œstradiol/testostérone) et l'augmentation de l'expression du récepteur à la FSH dans les cellules de la granulosa laissent penser à une maturation plus précoce et une meilleure sensibilité à l'action de la FSH. Cependant, cette maturation plus précoce est moins marquée que pour les brebis Booroola (*FecB<sup>B</sup>*) ou Inverdale (*FecX<sup>I</sup>*). Les autres marqueurs de la maturation des follicules ovariens (CYP19A1, CYP11A1, CYP17A1, LHCGR, et INHA) ne sont pas différents entre les deux génotypes (Drouilhet et al., 2010). Au cours de ma thèse, je n'ai pas eu accès aux ovaires des brebis expérimentales étudiées, et je n'ai pas pu compléter ces données dans le but de continuer le travail sur les caractéristiques zootechniques des brebis Lacaune *L/+* au locus *FecL*.

Les concentrations plasmatiques d'œstradiol mesurées au cours d'un cycle oestrien sont plus importantes (en moyenne 2 fois plus) en phase folliculaire chez les brebis *L/L*, conduisant à une augmentation de la fréquence des pulses de LH et *in fine* à un pic pré-ovulatoire de LH plus précoce (Drouilhet, 2010). Lorsque les données sont recalées par rapport au pic de LH, la concentration circulante de FSH reste inchangée au cours de la phase folliculaire mais a tendance à être plus élevée pendant la phase lutéale chez les brebis *L/L*, en particulier au moment du pic rebond de FSH (Figure 94, Mansanet, 2013).



J'ai également retrouvé cette avance du pic de LH chez les brebis *L/+* (Figure 82) et une concentration plus élevée de FSH au moment du pic rebond (Figure 83). En phase lutéale, les brebis *L/L* montraient une concentration plus élevée de progestérone 5 jours après le pic de LH (Figure 94).

J'observe également cette différence qui s'amorce chez les brebis *L/+* (Figure 90) mais que je n'ai pas pu confirmer car nous n'avons pas continué les prélèvements sur la totalité de la phase lutéale. Ces profils endocriniens différents entre les brebis *+/+* et porteuses de *FecL<sup>L</sup>* sont un phénotype qui n'avait pas été observé chez les brebis prolifiques Booroola (*FecB<sup>B</sup>*) et Inverdale (*FecX<sup>I</sup>*).

Par contre, les observations d'une part, de la concentration circulante en AMH très réduite chez les brebis prolifiques Booroola porteuses de *FecB<sup>B</sup>* (Estienne et al., 2015) et d'autre part que la mutation *FecL<sup>L</sup>* dans *B4GALNT2* pourrait cibler l'activité de l'inhibine A (Drouilhet et al., 2013) ont amené à mesurer les concentrations en AMH et inhibine A chez les brebis Lacaune. La Figure 95 montre que les brebis Lacaune *L/L* ont des concentrations circulantes en AMH et en inhibine A fortement réduites par rapport aux brebis *+/+* pendant tout le cycle œstrien. J'ai également confirmé ces observations avec les brebis *L/+*, de façon moins marquée, la mutation étant à l'état hétérozygote. Lors de sa thèse, C. Mansanet a quantifié l'expression folliculaire (ARN et protéine) des gènes codant pour l'AMH et les sous-unités de l'inhibine A (Mansanet, 2013). Il apparaît de façon surprenante, que l'expression de ces gènes n'est pas influencée par la mutation *FecL<sup>L</sup>*. Au contraire, en tenant compte des populations folliculaires, il semblerait même que les ovaires *L/L* soient en capacité de produire plus d'inhibine A et d'AMH que les ovaires *+/+*. Une hypothèse de rétention de ces hormones, en lien avec une influence de *FecL<sup>L</sup>* agissant sur la glycosylation d'éléments de la matrice extracellulaire et sur l'inhibine A elle-même, pourrait expliquer leur concentration circulante plus basse (Mansanet, 2013).

L'originalité de mon travail de thèse par rapport aux profils endocriniens est d'avoir pu les établir pendant les périodes pré et péri-pubertères, assez peu documentées chez les ovins. Alors que les profils d'AMH et d'inhibine A sont assez stables pendant le cycle œstrien, j'ai mis en évidence des variations importantes de ces profils de la naissance à la puberté. Alors que l'AMH est indétectable à la naissance, sa concentration plasmatique augmente régulièrement pour atteindre un maximum de 350 pg/ml en moyenne à l'âge de 2 mois. Cette concentration



en AMH redescend ensuite jusqu'à 3 mois pour se stabiliser à 50-100 pg/ml pendant la période pré-pubère. Ce pic précoce d'AMH en lien avec l'évolution du nombre de petits follicules en croissance, dont l'AMH est un très bon marqueur, (Monniaux et al., 2014) a également été observé chez les agnelles de race Sarde (Torres-Rovira et al., 2014, 2016) et Rasa Aragonesa (Lahoz et al., 2014), et également chez la génisse Maine-Anjou (Monniaux et al., 2013). Cette croissance folliculaire pourrait avoir comme « moteur » l'augmentation préalable de la concentration en FSH. En effet, cette dernière de 0,5 à 1 ng/ml à la naissance, augmente rapidement, jusqu'à 2 ng/ml à l'âge de 1 mois, puis chute vers 2 mois, lorsque la concentration en AMH est à son maximum. Cependant, chez les agnelles Sarde, ce même pic de FSH n'est observé que pour celles avec un nombre faible de follicules en croissance et donc peu d'AMH, ce qui ne supporterait pas cette hypothèse (Torres-Rovira et al., 2016). À l'inverse, en présence de nombreux follicules antraux et une concentration élevée en AMH, la FSH reste proche des taux de la naissance. Les auteurs avancent un rôle de l'inhibine pour expliquer les profils de FSH à cette période très précoce sans l'avoir quantifié. Les données que j'ai obtenues indiquent effectivement une présence d'inhibine A circulante à la naissance, qui décroît rapidement pendant les deux premières semaines, pouvant permettre une synthèse de FSH par l'hypophyse. Avec la croissance folliculaire (signée par l'AMH), la concentration en inhibine A augmente, pouvant expliquer la première baisse de FSH. Même si elle n'est pas le support de la croissance du nombre de follicules, cette baisse de FSH doit impacter la population des follicules antraux, dont le nombre doit diminuer, si l'on en croit la chute de la concentration en AMH entre 2 et 3 mois. Cependant, d'après des résultats récents chez la souris, la FSH interviendrait aussi directement pour inhiber l'expression de l'AMH à cette période (Devillers et al., 2019a). Ceci aurait pour conséquence également une chute de la concentration en inhibine A et par conséquent, une nouvelle montée de la concentration en FSH entre 3 et 4 mois. Ce nouveau pic de FSH pourrait entraîner la maturation d'une nouvelle vague de follicule produisant à nouveau de l'inhibine A dont la concentration remonte après 4 mois. Cependant, cela ne semble pas être suivi d'une augmentation du nombre de follicules antraux, puisque l'AMH reste stable à cette période. Cette périodicité dans les profils de ces hormones semble indiquer qu'un dialogue de l'axe hypophyso-gonadique, similaire à celui qui a lieu lors d'un cycle œstrien, se met en place pour le contrôle de la folliculogenèse très rapidement après la naissance. Ce phénomène que l'on retrouve dans l'espèce humaine est décrit sous le terme de « mini-puberté » (Devillers et al., 2019b).



Ces données devront être complétées par un dosage de l'œstradiol que je n'ai pas encore pu réaliser et par des échographies ovariennes régulières pour suivre l'évolution des populations folliculaires.

Ces profils et leurs interactions étant décrits de la naissance à l'âge de 8 mois, pour les concentrations moyennes des 43 agnelles Lacaune étudiées. J'observe un impact négatif de la mutation *FecL<sup>L</sup>* sur les profils d'AMH et inhibine A dont les concentrations sont diminuées, mais sans effet sur la FSH. L'AMH, en particulier, voit sa concentration diminuer d'environ 2 à 3 fois chez les agnelles *L/+*. Au pic d'AMH, qui intervient au même moment que chez les agnelles *+/+*, celui-ci atteint la concentration de 200 ng/ml chez les *L/+* alors qu'elle est de 550 ng/ml chez les *+/+*, ce qui laisserait penser à une moindre population de follicules antraux en croissance dans les ovaires des agnelles *L/+* mais dans un environnement en FSH identique. Là encore il faudrait réaliser un suivi échographique des follicules pour s'assurer que l'AMH chez les agnelles *L/+* reste bien un marqueur du nombre de follicules en croissance. En effet, alors que le nombre de follicules en croissance est plus élevé dans les ovaires de brebis Mérinos porteuses de la mutation *FecB<sup>B</sup>*, la concentration circulante en AMH chez ces brebis est fortement réduite (Estienne et al., 2015). Ainsi, dans le cas de la présence d'une mutation majeure de prolificité, l'AMH ne serait peut-être plus un bon marqueur de cette population de follicules. Cependant, la concentration en inhibine A, globalement plus faible chez les brebis *L/+*, pourrait quand même indiquer un nombre plus faible de follicules en croissance sensibles à la FSH. Pourtant, cette concentration plus faible en inhibine A ne semble pas avoir d'effet sur le profil de FSH des agnelles *+/+*.

Même avec des concentrations moindres en AMH et en inhibine A, les brebis *L/+* atteignent la puberté à un âge normal, voire avancé, pour la moitié d'entre-elles. J'ai tenté d'associer les données individuelles de ces hormones à l'apparition de la puberté et de la cyclicité et à la fertilité, sans succès, ces profils obtenus dans le jeune âge n'étant pas prédictifs des performances adultes que ce soit chez les *L/+* ou les *+/+*. Pourtant, chez les agnelles Rasa Aragonesa, l'AMH mesurée avant 4 mois semble prédictive de la fertilité induite par la PMSG à la première mise à la reproduction (Lahoz et al., 2012) et des données similaires ont été obtenues chez la génisse (Mossa et al., 2017).





Alors que le gène *B4GALNT2* n'est pas lié au système de signalisation TGF $\beta$ /BMP à l'image des autres gènes de proliféricité, il apparait que deux membres de ce système, AMH et inhibine A, sont impactés par la présence de la mutation *FecL<sup>L</sup>* qui induit une surexpression de ce gène dans les cellules de la granulosa, plaçant encore ce système au cœur de la régulation du nombre d'ovulations (Drouilhet et al., 2013). Contrairement à l'inhibine A, l'AMH n'a pas été identifiée comme une cible directe de l'activité de glycosylation de B4GALNT2. Cependant, il semblerait que l'AMH et l'inhibine A puissent être retenues dans les follicules limitant leur biodisponibilité *via* la circulation générale. Ce phénomène ne semble pas avoir d'influence directe en période pré et péri-pubère, et soit uniquement impliqué dans la régulation du taux d'ovulation cyclique. Comme proposé dans le cas de la mutation Booroola *FecB<sup>B</sup>* (Estienne et al., 2015), la baisse d'AMH pourrait mimer la perte de fonction de la signalisation BMP et participer ainsi au mécanisme de contrôle de la proliféricité chez les brebis Lacaune porteuses de la mutation *FecL<sup>L</sup>*. Le rôle de l'inhibine A est moins clair, sachant que même si elle est elle-même sous le contrôle de la signalisation BMP, elle ne serait pas impliquée dans le mécanisme de régulation du quota ovulatoire (Estienne et al., 2017). Pourtant, une immunisation contre l'inhibine est à l'origine d'une augmentation du taux d'ovulation et de la proliféricité *via* la stimulation du développement folliculaire chez la brebis (Campbell et al., 1995; Campbell and Scaramuzzi, 1995), la chèvre (Hennies et al., 2001; Medan et al., 2003) et la vache (Medan et al., 2006; Takedomi et al., 2005).



# Discussion générale et conclusion

Dans le cadre de ce travail de thèse j'ai pu atteindre mes deux principaux objectifs, qui sont de mettre en évidence la ségrégation de mutations à effet majeur sur la prolificité dans des populations ovines pour lesquelles cela n'avait jamais été décrit, et apporter des éléments supplémentaires de compréhension des effets de la mutation prolifique *FecL<sup>L</sup>* chez la brebis de race Lacaune.

Hormis les éléments scientifiques apportés par ces résultats et discutés précédemment, ce travail de thèse a apporté une information pratique « vous avez une mutation à effet majeur sur la prolificité qui ségrège dans votre population » à un certain nombre d'organismes de gestion génétique des races ovines allaitantes. Si l'ensemble de la filière ovine allaitante s'accorde sur le fait que d'un point de vue technico-économique, la marge brute augmente avec la productivité numérique, l'objectif optimal serait de ne produire que deux agneaux par portée, par brebis et par an. Effectivement, en deçà de cet optimum, un plus faible nombre d'agneaux nés est synonyme d'un manque à gagner et au-delà, une production numérique plus importante entraîne des charges additionnelles associées à l'allaitement artificiel et l'engraissement des agneaux surnuméraires (Caron, 2010; Fathallah et al., 2015; Jousseins et al., 2015).

La nouvelle de la présence d'une mutation qui augmente la prolificité est donc reçue avec plus ou moins d'enthousiasme par les organismes de sélection et les éleveurs. L'effet important des premières mutations découvertes et gérées, comme *FecB<sup>B</sup>* et *FecL<sup>L</sup>*, qui augmente la prolificité de +0,5 à +1,0 agneau par mise-bas, ainsi que les cas de stérilité engendrés par les mutations dans les gènes *BMP15* et *GDF9* inquiète la profession. Cependant, maintenant qu'elles sont identifiées, la présence de ces mutations doit être gérée en fonction de l'objectif de sélection de chacune des races conduisant, soit à la conservation et au contrôle de la fréquence de la mutation, soit à son éradication. Dans le cas du schéma de sélection Lacaune OVI-TEST, le progrès génétique sur la prolificité fait partie des objectifs de sélection. Dans ce cadre, la mutation *FecL<sup>L</sup>* est gérée depuis plus de 10 ans en génotypant toutes les agnelles de renouvellement et les mâles du centre d'IA avec un objectif de 50% de brebis non porteuses et 50% de brebis hétérozygotes (les homozygotes *FecL<sup>L</sup>* étant proscrites). Les derniers bilans sur la prolificité dans ce schéma font état de performances (> 2,1) au-delà des objectifs, posant la question de réduire la fréquence de *FecL<sup>L</sup>* dans le noyau de sélection.



Par ailleurs, OVI-TEST a fait le choix d'éradiquer l'autre mutation *FecX<sup>L</sup>* découverte en 2008 dans *BMP15* et qui conduit à un phénotype de stérilité à l'état homozygote. Néanmoins mon travail de thèse vient de mettre en évidence dans cette population la nouvelle mutation *FecX<sup>N</sup>* de *BMP15*. Cette mutation, dont il faut encore établir la fréquence en race Lacaune, a un effet plus faible que *FecL<sup>L</sup>*, ne crée pas de stérilité et pourrait se gérer à moindre coût de génotypage étant portée par le chromosome X (génotypage que des mâles). Une rétombee très concrète de mon travail de thèse est au final, une réflexion engagée par OVI-TEST de la transition de gestion de la mutation *FecL<sup>L</sup>* vers la mutation *FecX<sup>N</sup>* qui répondrait mieux aux objectifs de sélection.

La réflexion qui s'engage pour la gestion de *FecL<sup>L</sup>* et *FecX<sup>N</sup>* en Lacaune, pourra également servir en population Noire du Velay dans laquelle segrégent les deux mêmes mutations. L'avantage en Noire du Velay, c'est que mon travail de thèse a déjà permis d'établir des données solides sur la fréquence et l'effet de ces deux mutations et leur interaction sur la prolificité. Il appartient maintenant à l'organisme de gestion ROM Sélection de faire un choix entre les deux mutations, ou l'éradication des deux en fonction de son objectif de sélection. Cependant, l'option d'éradiquer les des deux mutations me paraît difficilement envisageable puisqu'environ 40% de la population de brebis est porteuse de l'une ou l'autre des mutations. Concernant les populations Blanche du Massif Central (*FecX<sup>N</sup>*), Mouton Vendéen (*FecX<sup>Gr</sup>*) et Ile de France (*FecX<sup>f</sup>*), j'ai présenté mes résultats aux organismes de gestion de ces races, mais aucune décision n'est encore prise. Pourtant, dans ces populations où la mutation est portée par le chromosome X, la prise en compte de cette information est cruciale pour l'indexation génétique de la prolificité. En effet, le calcul de l'index de prolificité est réalisé sur la base d'un modèle polygénique, prenant en compte les performances des ascendants puis de la descendance femelle, mais pas l'effet des gènes majeurs. Avec une mutation portée par le chromosome X, il peut exister de fortes anomalies dans les index avec de très grandes différences entre les valeurs des pères et celles de leurs fils à qui ils ne transmettent pas la mutation (Bodin et al., 2011). Par ailleurs, en l'absence de gène majeur sur le chromosome Y, l'index sur la descendance d'un mâle devrait être identique qu'il soit calculé au travers des performances de ses filles ou de ses petites filles. Mais, en présence d'une mutation sur le chromosome X, comme les pères ne transmettent pas la mutation à leurs fils et donc à leurs petites filles, l'index de prolificité d'un même mâle peut apparaître très différent, de très bon



améliorateur +0,35 calculé à partir de ses filles à détériorateur -0,24 à partir de ses petites filles (exemple dans la Figure 39, page 49).

Comme j'ai pu le montrer dans la seconde partie de ce travail de thèse, les mutations de prolificité par leur action biologique sur la fonction ovarienne peuvent avoir d'autres effets que strictement sur le nombre d'ovulation et la prolificité. C'est le cas de la mutation *FecL<sup>L</sup>* qui est associée à une précocité de la puberté chez les agnelles Lacaune, mais surtout à une amélioration de la fertilité en reproduction naturelle ou sur des cycles oestriens synchronisés en lien avec une sensibilité accrue à la PMSG. Ce paramètre de fertilité est également un levier important, au même titre que la prolificité, de l'efficacité technico-économique d'un élevage (Tableau 1 de l'introduction). Les retombées opérationnelles importantes pour OVI-TEST qui se dessinent à partir de ce travail de thèse, sont les adaptations des protocoles d'IA en fonction du génotype au locus *FecL*, en gérant plus particulièrement les doses de PMSG, mais aussi une réflexion sur le délai entre le retrait de l'éponge de fluogestone et l'IA, si elle devait se faire sans PMSG. En effet, le pic préovulatoire « naturel » de LH est plus précoce chez les brebis porteuses de *FecL<sup>L</sup>*. Une réflexion est en cours avec OVI-TEST pour compléter mes résultats de thèse et asseoir ces concepts dans le cadre de la réduction ou de l'interdiction de l'utilisation des hormones à usage vétérinaire.

En conclusion, en associant des approches de génétique, de génomique à haut-débit, et de biologie moléculaire et fonctionnelle, j'ai identifié cinq mutations à effet majeur associées à la prolificité dans huit populations ovines différentes. Je n'ai pas identifié de nouveaux gènes contrôlant la fonction ovarienne par ces approches car toutes ces mutations affectent des gènes déjà connus. Néanmoins deux d'entre-elles sont nouvellement identifiées par cette thèse dans le gène *FecX/BMP15*. En particulier, la mutation *FecX<sup>N</sup>*, à la différence des 9 autres mutations prolifiques connues de *BMP15*, montre un mécanisme original de régulation de l'expression de *BMP15*.

Une fois ces mutations identifiées, j'ai établi l'information de fréquence de la présence de chacune dans les populations et de leur effet sur la prolificité des brebis ou plus largement sur leur physiologie reproductive. Ces informations sont cruciales pour les prises de décisions des organismes responsables des schémas de sélection et la gestion future de ces mutations et les pratiques liées à leur présence.





# Références bibliographiques

- Adalsteinsson, S., Jonmundsson, J.V., Eythorsdottir, E., 1989. The high fecundity Thoka gene in Icelandic sheep. Presented at the Proceeding of the European Association for Animal Production, 40th Annual Meeting, Dublin, Ireland.
- Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S., Sunyaev, S.R., 2010. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* 7, 248–249. <https://doi.org/10.1038/nmeth0410-248>
- Ahlawat, S., Sharma, R., Maitra, A., 2013. Screening of indigenous goats for prolificacy associated DNA markers of sheep. *Gene* 517, 128–131. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.015>
- Al-Hendy, A., Moshynska, O., Saxena, A., Feyles, V., 2000. Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet* 356, 914. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02687-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02687-8)
- An, X., Ma, T., Hou, J., Fang, F., Han, P., Yan, Y., Zhao, H., Song, Y., Wang, J., Cao, B., 2013. Association analysis between variants in KISS1 gene and litter size in goats. *BMC Genet* 14, 63. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-63>
- An, X.P., Hou, J.X., Lei, Y.N., Gao, T.Y., Song, Y.X., Wang, J.G., Cao, B.Y., 2015. Two mutations in the 5'-flanking region of the KITLG gene are associated with litter size of dairy goats. *Anim. Genet.* 46, 308–311. <https://doi.org/10.1111/age.12277>
- Bahire, S.V., De, K., Kumar, D., Kataria, M., Kumar, S., 2019. Influence of fecundity gene on oestrus synchronization and gonadal steroid levels in Booroola carrier and non-carrier ewes. *Indian Journal of Small Ruminants* 25, 45–49.
- Baril, G., Institut national de la recherche agronomique (France), Station de physiologie de la reproduction, 1993. Manuel de formation pour l'insémination artificielle chez les ovins et les caprins, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. ed. FAO, Rome.
- Ben Jemaa, S., Ruesche, J., Sarry, J., Woloszyn, F., Lassoued, N., Fabre, S., 2018. The high prolificacy of D'man sheep is associated with the segregation of the FeCLL mutation in the B4GALNT2 gene. *Reproduction in Domestic Animals* 0. <https://doi.org/10.1111/rda.13391>
- Bendell, J.J., Dorrington, J.H., 1990. Epidermal Growth Factor Influences Growth and Differentiation of Rat Granulosa Cells. *Endocrinology* 127, 533–540. <https://doi.org/10.1210/endo-127-2-533>
- Benoit, M., Laignel, G., 2009. Performances techniques et économiques en élevage ovin viande biologique: observations en réseaux d'élevage et fermes expérimentales. *Innovations Agronomiques* 151–163.
- Bi, X.D., Chu, M.X., Jin, H.G., Fang, L., Ye, S.C., 2005. Estrogen receptor as a candidate gene for prolificacy of small tail Han sheep. *Yi Chuan Xue Bao* 32, 1060–1065.
- Bindon, B.M., 1984. Reproductive biology of the Booroola Merino sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 37, 163–189.
- Bindon, B.M., Findlay, J.K., Piper, L.R., 1985. Plasma FSH and LH in prepubertal Booroola ewe lambs. *Aust. J. Biol. Sci.* 38, 215–220.
- Blázquez-Medela, A.M., Jumabay, M., Rajbhandari, P., Sallam, T., Guo, Y., Yao, J., Vergnes, L., Reue, K., Zhang, L., Yao, Y., Fogelman, A.M., Tontonoz, P., Lusis, A.J., Wu, X., Boström, K.I., 2019. Noggin depletion in adipocytes promotes obesity in mice. *Molecular Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.04.004>
- Bodensteiner, K.J., Clay, C.M., Moeller, C.L., Sawyer, H.R., 1999. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* 60, 381–386. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.381>

- Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., Mulsant, P., 2007. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. *Endocrinology* 148, 393–400. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0764>
- Bodin, L., Elsen, J.M., Station d'amélioration génétique des animaux, 1989. Variability of litter size of french sheep breeds following natural or induced ovulation. *Animal Production* 535–541.
- Bodin, L., Raoul, J., Demars, J., Drouilhet, L., Mulsant, P., Sarry, J., Tabet, C., Tosser-Klopp, G., Fabre, S., Boscher, M.Y., others, 2011. Etat des lieux et gestion pratique des gènes d'ovulation détectés dans les races ovines françaises, in: 18èmes Rencontres Recherches Ruminants. Institut de l'Élevage, Paris, France, pp. 393–400.
- Bodin, L., SanCristobal, M., Lecerf, F., Mulsant, P., Bibé, B., Lajous, D., Belloc, J.-P., Eychenne, F., Amigues, Y., Elsen, J.-M., 2002. Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep. *Genetics Selection Evolution* 34, 447. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-4-447>
- Bonnet, A., Cabau, C., Bouchez, O., Sarry, J., Marsaud, N., Foissac, S., Woloszyn, F., Mulsant, P., Mandon-Pepin, B., 2013. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. *BMC Genomics* 14, 904. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-904>
- Boujenane, I., 1996. Th D'man, in: *Prolific Sheep*, CAB International. Walingford, UK, pp. 109–120.
- Bradford, G.E., 1985. Selection for litter size., in: Land, R.B., Robinson, D.W. (Eds.), *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworths, London, pp. 3–18.
- Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J., Nohe, A., 2011. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* 23, 609–620. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.003>
- Braw-Tal, R., Bor, A., Gootwine, E., 1993. Plasma immunoreactive inhibin and FSH in prepubertal Assaf and Booroola-Assaf ewe lambs. *Domestic Animal Endocrinology* 10, 87–94. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(93\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0739-7240(93)90014-3)
- Caixeta, E.S., Sutton-McDowall, M.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., Price, C.A., Machado, M.F., Lima, P.F., Buratini, J., 2013. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Reproduction* 146, 27–35. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0079>
- Campbell, B.K., Dobson, H., Baird, D.T., Scaramuzzi, R.J., 1999. Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 117, 355–367. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1170355>
- Campbell, B.K., Gordon, B.M., Tsonis, C.G., Scaramuzzi, R.J., 1995. The effect of acute immunoneutralisation of inhibin in ewes during the early luteal phase of the oestrous cycle on ovarian hormone secretion and follicular development. *Journal of Endocrinology* 145, 479–490. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1450479>
- Campbell, B.K., Scaramuzzi, R.J., 1995. Effect of acute immunoneutralization of inhibin in ewes during the late luteal phase of the oestrous cycle on ovarian hormone secretion and follicular development during the subsequent follicular phase. *Reproduction* 104, 337–345. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1040337>
- Campbell, B.K., Souza, C.J.H., Skinner, A.J., Webb, R., Baird, D.T., 2006. Enhanced Response of Granulosa and Theca Cells from Sheep Carriers of the FecB Mutation in Vitro to Gonadotropins and Bone Morphogenetic Protein-2, -4, and -6. *Endocrinology* 147, 1608–1620. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0604>

- Cao, G.L., Chu, M.X., Fang, L., Feng, T., Di, R., Li, N., 2011. Analysis on DNA sequence of GPR54 gene and its association with litter size in goats. *Mol. Biol. Rep.* 38, 3839–3848. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0499-y>
- Caron, V.D., 2010. IMPACT DE LA PROLIFICITÉ SUR LA RENTABILITÉ DE L'ENTREPRISE OVINE QUÉBÉCOISE : APPROCHE PAR MODÉLISATION.
- Castonguay, F., 2018. *La\_reproduction\_chez\_les\_ovins\_2018.pdf* [WWW Document]. URL [https://ovins.fsaa.ulaval.ca/fileadmin/Fichiers/Conferences/La\\_reproduction\\_chez\\_les\\_ovins\\_2018.pdf](https://ovins.fsaa.ulaval.ca/fileadmin/Fichiers/Conferences/La_reproduction_chez_les_ovins_2018.pdf) (accessed 8.28.19).
- Castonguay, F., Minvielle, F., Dufour, J.J., 1990. REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF BOORoola × FINNISH LANDRACE AND BOORoola × SUFFOLK EWE LAMBS, HETEROZYGOUS FOR THE *F* GENE, AND GROWTH TRAITS OF THEIR THREE-WAY CROSS LAMBS. *Canadian Journal of Animal Science* 70, 55–65. <https://doi.org/10.4141/cjas90-006>
- Chang, C.C., Chow, C.C., Tellier, L.C., Vattikuti, S., Purcell, S.M., Lee, J.J., 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* 4, 7. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8>
- Chang, H.-M., Cheng, J.-C., Klausen, C., Leung, P.C.K., 2013. BMP15 suppresses progesterone production by down-regulating StAR via ALK3 in human granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 27, 2093–2104. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1233>
- Chantepie, L., 2019. Genome-wide association study (GWAS) identifies the *FecXGr* allele in BMP15 segregating in Rasa Aragonesa sheep breed.
- Chantepie, L., Bodin, L., Sarry, J., Woloszyn, F., Ruesche, J., Drouilhet, L., Fabre, S., 2018. Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du Velay and Mouton Vendéen sheep breeds. *Livestock Science* 216, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.07.007>
- Chaves, M.S., Passos, H.S., Luz, V.B., Ferreira-Silva, J.C., Melo, E.O., Paiva, S.R., Bartolomeu, C.C., Oliveira, M.A.L., Azevedo, H.C., 2019. Evaluation of morphology, morphometry and follicular dynamics in *FecGE* genotyped ewes. *Theriogenology* 136, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.033>
- Chiquette, J., Minvielle, F., Dufour, J.J., 1984. Prepubertal Plasma Lh Concentration, Ovulation Rate and Prolificacy in Finn, Suffolk and Finn-Suffolk Ewes. *Can. J. Anim. Sci.* 64, 67–72. <https://doi.org/10.4141/cjas84-009>
- Christoforou, E.R., Pitman, J.L., 2019. Intrafollicular growth differentiation factor 9: bone morphogenetic 15 ratio determines litter size in mammals†. *Biol. Reprod.* 100, 1333–1343. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz011>
- Chu, M., Xiao, C., Feng, T., Fu, Y., Cao, G., Fang, L., Di, R., Tang, Q., Huang, D., Ma, Y., Li, K., Li, N., 2012. Polymorphisms of *KISS-1* and *GPR54* genes and their relationships with litter size in sheep. *Mol. Biol. Rep.* 39, 3291–3297. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1097-3>
- Chu, M.X., Mu, Y.L., Fang, L., Ye, S.C., Sun, S.H., 2007. Prolactin receptor as a candidate gene for prolificacy of small tail han sheep. *Anim. Biotechnol.* 18, 65–73. <https://doi.org/10.1080/10495390601090950>
- Chu, M.X., Wu, Z.H., Feng, T., Cao, G.L., Fang, L., Di, R., Huang, D.W., Li, X.W., Li, N., 2011a. Polymorphism of *GDF9* gene and its association with litter size in goats. *Vet. Res. Commun.* 35, 329–336. <https://doi.org/10.1007/s11259-011-9476-8>
- Chu, M.X., Yang, J., Feng, T., Cao, G.L., Fang, L., Di, R., Huang, D.W., Tang, Q.Q., Ma, Y.H., Li, K., Li, N., 2011b. *GDF9* as a candidate gene for prolificacy of Small Tail Han sheep. *Mol. Biol. Rep.* 38, 5199–5204. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0670-5>
- Cole, H.H., Miller, R.F., 1935. Changes in the reproductive organs of the ewe with some data bearing on their control. *American Journal of Anatomy* 57, 39–97. <https://doi.org/10.1002/aja.1000570103>

- Crawford, J.L., McNatty, K.P., 2012. The ratio of growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 mRNA expression is tightly co-regulated and differs between species over a wide range of ovulation rates. *Molecular and Cellular Endocrinology* 348, 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.033>
- Cribu, E.P., Matejka, M., Denis, B., Malher, X., 1988. Etude chromosomique d'un hybride chèvre x mouton fertile. *Génétique sélection évolution* 20, 379–386.
- Davis, G.H., 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol* 37, S11–S23. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-37-S1-S11>
- Davis, G.H., Balakrishnan, L., Ross, I.K., Wilson, T., Galloway, S.M., Lumsden, B.M., Hanrahan, J.P., Mullen, M., Mao, X.Z., Wang, G.L., Zhao, Z.S., Zeng, Y.Q., Robinson, J.J., Mavrogenis, A.P., Papachristoforou, C., Peter, C., Baumung, R., Cardyn, P., Boujenane, I., Cockett, N.E., Eythorsdottir, E., Arranz, J.J., Notter, D.R., 2006. Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. *Animal Reproduction Science* 92, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.001>
- Davis, G.H., Bruce, G.D., Dodds, K.G., 2001. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecX I) and Hanna (FecX H) sheep. <http://www.aaabg.org/livestocklibrary/2001/ab01041.pdf>.
- Davis, G.H., Dodds, K.G., Bruce, G.D., 1999. Combined effect of the inverdale and booroola prolificacy genes on ovulation rate in sheep 4.
- Davis, G.H., Galloway, S.M., Ross, I.K., Gregan, S.M., Ward, J., Nimbkar, B.V., Ghalsasi, P.M., Nimbkar, C., Gray, G.D., Subandriyo, null, Inounu, I., Tiesnamurti, B., Martyniuk, E., Eythorsdottir, E., Mulsant, P., Lecerf, F., Hanrahan, J.P., Bradford, G.E., Wilson, T., 2002. DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biol. Reprod.* 66, 1869–1874. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.6.1869>
- Davis, G.H., McEwan, J.C., Fennessy, P.F., Dodds, K.G., Farquhar, P.A., 1991. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. *Biol. Reprod.* 44, 620–624.
- Davis, G.H., McEwan, J.C., Fennessy, P.F., Dodds, K.G., McNatty, K.P., O, W.-S., 1992. Infertility Due to Bilateral Ovarian Hypoplasia in Sheep Homozygous (FecX1 FecX1) for the Inverdale Prolificacy Gene Located on the X Chromosome. *Biol Reprod* 46, 636–640. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.4.636>
- Davis, G.H., Montgomery, G.W., Allison, A.J., Kelly, R.W., Bray, A.R., 1982. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 25, 525–529. <https://doi.org/10.1080/00288233.1982.10425216>
- Davis, S.J.M., 2008. Zooarchaeological evidence for Moslem and Christian improvements of sheep and cattle in Portugal. *Journal of Archaeological Science* 35, 991–1010. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2007.07.001>
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., Tosser-Klopp, G., Mulsant, P., Nowak, Z., Drobik, W., Martyniuk, E., Bodin, L., 2013. Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genet.* 9, e1003482. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003482>
- DePristo, M.A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K.V., Maguire, J.R., Hartl, C., Philippakis, A.A., del Angel, G., Rivas, M.A., Hanna, M., McKenna, A., Fennell, T.J., Kernysky, A.M., Sivachenko, A.Y., Cibulskis, K., Gabriel, S.B., Altshuler, D., Daly, M.J., 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* 43, 491–498. <https://doi.org/10.1038/ng.806>
- Derynck, R., Feng, X.-H., 1997. TGF- $\beta$  receptor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1333, F105–F150. [https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(97\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(97)00017-6)

- Devillers, M.M., Petit, F., Cluzet, V., François, C.M., Giton, F., Garrel, G., Cohen-Tannoudji, J., Guigon, C.J., 2019a. FSH inhibits AMH to support ovarian estradiol synthesis in infantile mice. *J. Endocrinol.* 240, 215–228. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0313>
- Devillers, M.M., Petit, F., Cluzet, V., François, C.M., Giton, F., Garrel, G., Cohen-Tannoudji, J., Guigon, C.J., 2019b. [Ovarian estradiol production during mini-puberty: importance of the cross-talk between FSH and AMH]. *Med Sci (Paris)* 35, 201–203. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019042>
- Dieny, M., 2011. Elaboration d'indices de synthèse en réponse à un objectif de sélection sur bases économiques en race ovin Blanche du Massif Central. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'ingénieur agronome.
- Dixit, H., Rao, L.K., Padmalatha, V.V., Kanakavalli, M., Deenadayal, M., Gupta, N., Chakrabarty, B., Singh, L., 2006. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum. Genet.* 119, 408–415. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0150-0>
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N., Matzuk, M.M., 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531–535. <https://doi.org/10.1038/383531a0>
- Driancourt, M.A., Cahill, L.P., Bindon, B.M., 1985. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. *Reproduction* 73, 93–107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0730093>
- Driancourt, M.A., Gauld, I.K., Terqui, M., Webb, R., 1986. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *Reproduction* 78, 565–575. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0780565>
- Driancourt, M.A., Thatcher, W.W., Terqui, M., Andrieu, D., 1991. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domestic Animal Endocrinology* 8, 209–221. [https://doi.org/10.1016/0739-7240\(91\)90057-Q](https://doi.org/10.1016/0739-7240(91)90057-Q)
- Drouilhet, L., 2010. Identification d'un gène majeur influençant le taux d'ovulation en race ovine Lacaune (phd). Université de Toulouse, Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Drouilhet, L., Lecerf, F., Bodin, L., Fabre, S., Mulsant, P., 2009. Fine mapping of the *FecL* locus influencing prolificacy in Lacaune sheep. *Animal Genetics* 40, 804–812. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01919.x>
- Drouilhet, L., Mansanet, C., Sarry, J., Tabet, K., Bardou, P., Woloszyn, F., Lluch, J., Harichaux, G., Viguié, C., Monniaux, D., Bodin, L., Mulsant, P., Fabre, S., 2013. The Highly Prolific Phenotype of Lacaune Sheep Is Associated with an Ectopic Expression of the *B4GALNT2* Gene within the Ovary. *PLOS Genetics* 9, e1003809. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003809>
- Drouilhet, L., Taragnat, C., Fontaine, J., Duittoz, A., Mulsant, P., Bodin, L., Fabre, S., 2010. Endocrine Characterization of the Reproductive Axis in Highly Prolific Lacaune Sheep Homozygous for the *FecLL* Mutation. *Biol Reprod* 82, 815–824. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082065>
- Dube, J.L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K.M., Celeste, A.J., Matzuk, M.M., 1998. Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes | *Molecular Endocrinology* | Oxford Academic [WWW Document]. URL <https://academic.oup.com/mend/article-lookup/doi/10.1210/mend.12.12.0206> (accessed 8.25.17).
- Dudouet, C., 2016. La production du mouton, 4e édition. ed. France Agricole, Paris, France.
- Durlinger, A.L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P., 1999. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140, 5789–5796. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7204>

- Echternkamp, S.E., Spicer, L.J., Gregory, K.E., Canning, S.F., Hammond, J.M., 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.* 43, 8–14. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.8>
- Edson, M.A., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M., 2009. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocr Rev* 30, 624–712. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0012>
- Edwards, S.J., Reader, K.L., Lun, S., Western, A., Lawrence, S., McNatty, K.P., Juengel, J.L., 2008. The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. *Endocrinology* 149, 1026–1030. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1328>
- Elvin, J.A., Clark, A.T., Wang, P., Wolfman, N.M., Matzuk, M.M., 1999. Paracrine Actions Of Growth Differentiation Factor-9 in the Mammalian Ovary. *Mol Endocrinol* 13, 1035–1048. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0310>
- Elvin, J.A., Yan, C., Matzuk, M.M., 2000. Oocyte-expressed TGF- $\beta$  superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 159, 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00185-9](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00185-9)
- Estienne, A., Lahoz, B., Jarrier, P., Bodin, L., Folch, J., Alabart, J.-L., Fabre, S., Monniaux, D., 2017. BMP15 regulates the inhibin/activin system independently of ovulation rate control in sheep. *Reproduction* 153, 395–404. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0507>
- Estienne, A., Pierre, A., di Clemente, N., Picard, J.-Y., Jarrier, P., Mansanet, C., Monniaux, D., Fabre, S., 2015. Anti-Müllerian Hormone Regulation by the Bone Morphogenetic Proteins in the Sheep Ovary: Deciphering a Direct Regulatory Pathway. *Endocrinology* 156, 301–313. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1551>
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monget, P., Monniaux, D., 2006. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 20. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-20>
- Fabre, S., Pierre, A., Pisselet, C., Mulsant, P., Lecerf, F., Pohl, J., Monget, P., Monniaux, D., 2003. The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor-IB functionality. *J Endocrinol* 177, 435–444. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1770435>
- Fathallah, S., Bodin, L., David, I., 2015. Variabilités de la Taille de Portée des Ovins (Thèse Mod. Math. Appl.). INPT.
- Faure, M.-O., Nicol, L., Fabre, S., Fontaine, J., Mohoric, N., McNeilly, A., Taragnat, C., 2005. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol* 186, 109–121. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05988>
- Feary, E.S., Juengel, J.L., Smith, P., French, M.C., O'Connell, A.R., Lawrence, S.B., Galloway, S.M., Davis, G.H., McNatty, K.P., 2007. Patterns of Expression of Messenger RNAs Encoding GDF9, BMP15, TGFBR1, BMPR1B, and BMPR2 During Follicular Development and Characterization of Ovarian Follicular Populations in Ewes Carrying the Woodlands FecX2W Mutation. *Biol Reprod* 77, 990–998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062752>
- Feng, T., Chu, M.-X., Cao, G.-L., Huang, D.-W., Di, R., Liu, Q.-Y., Pan, Z.-Y., Jin, M., Zhang, Y.-J., 2014. Screening for S32G mutation of BMP15 gene in 18 goat breeds. *Turk J Vet Anim Sci* 38, 463–468.
- Feng, T., Geng, C.X., Lang, X.Z., Chu, M.X., Cao, G.L., Di, R., Fang, L., Chen, H.Q., Liu, X.L., Li, N., 2011. Polymorphisms of caprine GDF9 gene and their association with litter size in Jining Grey goats. *Mol. Biol. Rep.* 38, 5189–5197. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0669-y>
- Feng, T., Zhao, Y.Z., Chu, M.X., Zhang, Y.J., Fang, L., Di, R., Cao, G.L., Li, N., 2009. Association between sexual precocity and alleles of KISS-1 and GPR54 genes in goats. *Anim. Biotechnol.* 20, 172–176. <https://doi.org/10.1080/10495390903004493>

- Feng, X.H., Derynck, R., 1997. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J.* 16, 3912–3923. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3912>
- Fitzgerald, J., Butler, W.R., 1982. Seasonal Effects and Hormonal Patterns Related to Puberty in Ewe Lambs. *Biol Reprod* 27, 853–863. <https://doi.org/10.1095/biolreprod27.4.853>
- Fonseca, D.J., Ortega-Recalde, O., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Patiño, L.C., Bermúdez, O.M., Ortiz, A.M., Restrepo, C.M., Lucena, E., Laissue, P., 2014. BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reproductive BioMedicine Online* 29, 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.018>
- Forcada, F., Zúñiga, O., Abecia, J.A., 2002. The role of nutrition in the regulation of LH secretion during anestrus by the serotonergic and dopaminergic systems in Mediterranean ewes treated with melatonin. *Theriogenology* 58, 1303–1313. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00972-x](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00972-x)
- Foster, D.L., Ryan, K.D., 1981. Premature seasonal inhibition of tonic LH secretion by oestradiol in the female lamb and its consequences. *J. Reprod. Fertil.* 63, 289–294. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630289>
- Foster, D.L., Ryan, K.D., 1979. Endocrine Mechanisms Governing Transition into Adulthood: A Marked Decrease in Inhibitory Feedback Action of Estradiol on Tonic Secretion of Luteinizing Hormone in the Lamb during Puberty. *Endocrinology* 105, 896–904. <https://doi.org/10.1210/endo-105-4-896>
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P.E., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luero, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H., Ritvos, O., 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25, 279–283. <https://doi.org/10.1038/77033>
- Glister, C., Kemp, C.F., Knight, P.G., 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 127, 239–254. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00090>
- Gosden, R.G., Treloar, S.A., Martin, N.G., Cherkas, L.F., Spector, T.D., Faddy, M.J., Silber, S.J., 2007. Prevalence of premature ovarian failure in monozygotic and dizygotic twins. *Hum. Reprod.* 22, 610–615. <https://doi.org/10.1093/humrep/del382>
- Gray, A.M., Mason, A.J., 1990. Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* 247, 1328–1330. <https://doi.org/10.1126/science.2315700>
- Guerrier, J., Praud, J.P., Poivey, J.P., Batut, H., Grenet, G., Boux, J., 2010. Définition économique des objectifs de sélection en ovins allaitants. Application à la race Blanche du Massif Central. Presented at the 17èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France, pp. 443–446.
- Gui, L.-M., Joyce, I.M., 2005. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. *Biol. Reprod.* 72, 195–199. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.033357>
- Hakuno, N., Koji, T., Yano, T., Kobayashi, N., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Nakane, P.K., 1996. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137, 1938–1948. <https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612534>
- Haldar, A., French, M.C., Brauning, R., Edwards, S.J., O'Connell, A.R., Farquhar, P.A., Davis, G.H., Johnstone, P.D., Juengel, J.L., 2014. Single-Nucleotide Polymorphisms in the LEPR Gene Are

- Associated with Divergent Phenotypes for Age at Onset of Puberty in Daisdale Ewes. *Biol Reprod* 90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115923>
- Hanrahan, J., 1980. Ovulation rate as the selection criterion for litter size in sheep.
- Hanrahan, J.P. (Agriculture and F.D.A., 1991. Evidence for single gene effects on ovulation rate in the Cambridge and Belclare breeds, in: *Colloques de l'INRA (France)*. Presented at the Major genes for reproduction in sheep, Toulouse (France), 16-18 Jul 1990, INRA.
- Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R., Galloway, S.M., 2004. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*)1. *Biology of Reproduction* 70, 900–909. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- Hayashi, M., McGee, E.A., Min, G., Klein, C., Rose, U.M., van Duin, M., Hsueh, A.J., 1999. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140, 1236–1244. <https://doi.org/10.1210/endo.140.3.6548>
- He, X., Zhang, Z., Liu, Q., Chu, M., 2019. Polymorphisms of the melatonin receptor 1A gene that affects the reproductive seasonality and litter size in Small Tail Han sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 0. <https://doi.org/10.1111/rda.13538>
- He, Y., Ma, X., Zang, C., Li, J., 2010. Candidate genes polymorphism and its association to prolificacy in chinese goats. *Journal of Agricultural Science* 2, 88–92. <https://doi.org/10.1.1.666.7639>
- Heath, D.A., Pitman, J.L., McNatty, K.P., 2017. Molecular forms of ruminant BMP15 and GDF9 and putative interactions with receptors. *Reproduction* 154, 521–534. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0188>
- Heaton, M.P., Smith, T.P.L., Freking, B.A., Workman, A.M., Bennett, G.L., Carnahan, J.K., Kalbfleisch, T.S., 2017. Using sheep genomes from diverse U.S. breeds to identify missense variants in genes affecting fecundity. *F1000Res* 6, 1303. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12216.1>
- Heldin, C.-H., Miyazono, K., Dijke, P. ten, 1997. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465. <https://doi.org/10.1038/37284>
- Henderson, K.M., McNatty, K.P., O'Keeffe, L.E., Lun, S., Heath, D.A., Prisk, M.D., 1987. Differences in gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from Booroola  $\times$  Merino ewes which were homozygous, heterozygous or non-carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. *Reproduction* 81, 395–402. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0810395>
- Hennies, M., Voglmayr, J., Dietrich, E., Stollmann, M., Moeller, R., Holtz, W., 2001. Hormonal Response of Female Goats to Active Immunization against a Recombinant Human Inhibin alpha-subunit, and establishment of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Caprine Follicle-stimulating Hormone. *Reproduction in Domestic Animals* 36, 65–71. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.00250.x>
- Hochereau-de Reviers, M.T., Perreau, C., Cognié, Y., 1997. Effects of the Booroola gene FecBB on somatic and germ cells of the fetal testis. *Reprod. Nutr. Dev.* 37, 627–635.
- Hoekstra, C., Zhao, Z.Z., Lambalk, C.B., Willemsen, G., Martin, N.G., Boomsma, D.I., Montgomery, G.W., 2008. Dizygotic twinning. *Hum. Reprod. Update* 14, 37–47. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm036>
- Hreinsson, J.G., Scott, J.E., Rasmussen, C., Swahn, M.L., Hsueh, A.J.W., Hovatta, O., 2002. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 316–321. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8185>



- Huffman, L.J., Keith Inskeep, E., Goodman, R.L., 1987. Changes in Episodic Luteinizing Hormone Secretion Leading to Puberty in the Lamb. *Biol Reprod* 37, 755–761. <https://doi.org/10.1095/biolreprod37.4.755>
- Hussein, T.S., Thompson, J.G., Gilchrist, R.B., 2006. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev. Biol.* 296, 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.026>
- Hutt, K.J., McLaughlin, E.A., Holland, M.K., 2006. KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biol. Reprod.* 75, 421–433. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.051516>
- IDELE, 2019. Bilan du Contrôle de Performances Ovins Allaitants - Campagne 2018, Résultats. Institut de l'Élevage.
- International Sheep Genomics Consortium, Archibald, A.L., Cockett, N.E., Dalrymple, B.P., Faraut, T., Kijas, J.W., Maddox, J.F., McEwan, J.C., Hutton Oddy, V., Raadsma, H.W., Wade, C., Wang, J., Wang, W., Xun, X., 2010. The sheep genome reference sequence: a work in progress. *Anim. Genet.* 41, 449–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02100.x>
- Israel, D.I., Nove, J., Kerns, K.M., Kaufman, R.J., Rosen, V., Cox, K.A., Wozney, J.M., 1996. Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors* 13, 291–300.
- Izumi, N., Mizuguchi, S., Inagaki, Y., Saika, S., Kawada, N., Nakajima, Y., Inoue, K., Suehiro, S., Friedman, S.L., Ikeda, K., 2006. BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 290, NaN-NaN. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00171.2005>
- Jaatinen, R., Laitinen, M.P., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinheimo, K., Lehtonen, E., Ritvos, O., 1999. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156, 189–193. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(99\)00100-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(99)00100-8)
- Jemmali, B., Bedhiaf, S., Djemali, M., 2012. In the search of genetic polymorphism of bone morphogenetic protein with PCR-RFLP in sheep. *J Anim Sci Adv Suppl.* 3.1, 268–273.
- Jonmundsson, J.V., Adalsteinsson, S., 1984. Single genes for fecundity in Icelandic sheep. *Genetics of reproduction in sheep / edited by R.B. Land, D.W. Robinson.*
- Jousseins, C., Delmas, D., Baup, J.C., Dielenseger, E., Reeb, A., Martin, P., Métivier, A.J., 2015. Résultats 2015 des exploitations ovines allaitantes de Midi-Pyrénées.
- Juengel, J.L., Bibby, A.H., Reader, K.L., Lun, S., Quirke, L.D., Haydon, L.J., McNatty, K.P., 2004. The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2, 78. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-78>
- Juengel, J.L., French, M.C., O'Connell, A.R., Edwards, S.J., Haldar, A., Brauning, R., Farquhar, P.A., Dodds, K.G., Galloway, S.M., Johnstone, P.D., Davis, G.H., 2015. Mutations in the leptin receptor gene associated with delayed onset of puberty are also associated with decreased ovulation and lambing rates in prolific Davedale sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* <https://doi.org/10.1071/RD14382>
- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Heath, D.A., Smith, P., Reader, K.L., Lawrence, S.B., O'Connell, A.R., Laitinen, M.P.E., Cranfield, M., Groome, N.P., Ritvos, O., McNatty, K.P., 2002. Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 Are Essential for Ovarian Follicular Development in Sheep. *Biol Reprod* 67, 1777–1789. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>
- Kamalludin, M.H., Garcia-Guerra, A., Wiltbank, M.C., Kirkpatrick, B.W., 2018. Trio, a novel high fecundity allele: I. Transcriptome analysis of granulosa cells from carriers and noncarriers of a major gene for bovine ovulation rate. *Biol. Reprod.* 98, 323–334. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox133>

- Keisler, D.H., Inskip, E.K., Dailey, R.A., 1983. First Luteal Tissue in Ewe Lambs: Influence on Subsequent Ovarian Activity and Response to Hysterectomy. *J Anim Sci* 57, 150–156. <https://doi.org/10.2527/jas1983.571150x>
- Kendall, N.R., Gutierrez, C.G., Scaramuzzi, R.J., Baird, D.T., Webb, R., Campbell, B.K., 2004. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction* 128, 757–765. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00256>
- Kenyon, P.R., Thompson, A.N., Morris, S.T., 2014. Breeding ewe lambs successfully to improve lifetime performance. *Small Ruminant Research, Special Issue: Keynote lectures of the 8th International Sheep Veterinary Congress* 118, 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.022>
- Kim, E.-S., Shi, X., Cobanoglu, O., Weigel, K., Berger, P.J., Kirkpatrick, B.W., 2009. Refined mapping of twinning-rate quantitative trait loci on bovine chromosome 5 and analysis of insulin-like growth factor-1 as a positional candidate gene. *J. Anim. Sci.* 87, 835–843. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1252>
- King, J.W.B., Russel, A.J.F., Wolf, B.T., Beck, N.F.G., 1990. Crossing experiments with the Thoka gene from Icelandic sheep. XV. Beef cattle, sheep and pig genetics and breeding, fibre, fur and meat quality., 123–126.
- Kirkpatrick, B.W., Mengelt, A., Schulman, N., Martin, I.C., 1998. Identification of quantitative trait loci for prolificacy and growth in mice. *Mamm. Genome* 9, 97–102. <https://doi.org/10.1007/s003359900696>
- Kirkpatrick, B.W., Morris, C.A., 2015. A Major Gene for Bovine Ovulation Rate. *PLOS ONE* 10, e0129025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129025>
- Knight, P.G., Satchell, L., Glister, C., 2012. Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Mol. Cell. Endocrinol.* 359, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.04.024>
- Kramm, K., Engel, C., Grohmann, D., 2019. Transcription initiation factor TBP: old friend new questions. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 411–423. <https://doi.org/10.1042/BST20180623>
- Kumar, S., Mishra, A.K., Kolte, A.P., Arora, A.L., Singh, D., Singh, V.K., 2008. Effects of the Booroola (FecB) genotypes on growth performance, ewe's productivity efficiency and litter size in Garole×Malpura sheep. *Animal Reproduction Science* 105, 319–331. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.012>
- Lahoz, B., Alabart, J.L., Cocero, M.J., Monniaux, D., Echegoyen, E., Sánchez, P., Folch, J., 2014. Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology* 81, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.033>
- Lahoz, B., Alabart, J.L., Jurado, J.J., Calvo, J.H., Martínez-Royo, A., Fantova, E., Folch, J., 2011. Effect of the FecXR polymorphism in the bone morphogenetic protein 15 gene on natural or equine chorionic gonadotropin-induced ovulation rate and litter size in Rasa Aragonesa ewes and implications for on-farm application. *J Anim Sci* 89, 3522–3530. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3828>
- Lahoz, B., Alabart, J.L., Monniaux, D., Mermillod, P., Folch, J., 2012. Anti-Müllerian hormone plasma concentration in prepubertal ewe lambs as a predictor of their fertility at a young age. *BMC Veterinary Research* 8, 118. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-118>
- Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., Rekik, M., Fabre, S., Bedhiaf-Romdhani, S., 2017. FecX Bar a Novel BMP15 mutation responsible for prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep. *BMC Genet.* 18, 43. <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0510-x>
- Lecerf, F., Mulsant, P., 2002. LOCALISATION AND MAPPING OF A MAJOR GENE CONTROLLING OVULATION RATE IN LACAUNE SHEEP. . *Reproduction* 4.

- Lee, N.Y., Kirkbride, K.C., Sheu, R.D., Blobe, G.C., 2009. The transforming growth factor-beta type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK)3 and ALK6 receptors. *Mol. Biol. Cell* 20, 4362–4370. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0539>
- Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., Vale, W., 2000. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404, 411–414. <https://doi.org/10.1038/35006129>
- Li, Q., Rajanahally, S., Edson, M.A., Matzuk, M.M., 2009. Stable expression and characterization of N-terminal tagged recombinant human bone morphogenetic protein 15. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 779–788. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap062>
- Li, Y.X., Zhang, J., Qian, Y., Meng, C.H., Wang, H.L., Tao, X.J., Zhong, S., Cao, S.X., Li, Q.F., 2015. Molecular characterization, expression, polymorphism of NR5A2 and its relationship with litter size in Hu sheep. *Genet. Mol. Res.* 14, 12765–12775. <https://doi.org/10.4238/2015.October.19.20>
- Liao, W.X., Moore, R.K., Otsuka, F., Shimasaki, S., 2003. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *J. Biol. Chem.* 278, 3713–3719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210598200>
- Liao, W.X., Moore, R.K., Shimasaki, S., 2004. Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *J. Biol. Chem.* 279, 17391–17396. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401050200>
- Lin, Z.-L., Li, Y.-H., Xu, Y.-N., Wang, Q.-L., Namgoong, S., Cui, X.-S., Kim, N.-H., 2014. Effects of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 on the in vitro maturation of porcine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 219–227. <https://doi.org/10.1111/rda.12254>
- Liu, L., Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Jagarlamudi, K., Shen, Y., Gunnarsson, D., Selstam, G., Boman, K., Liu, K., 2007. Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development* 134, 199–209. <https://doi.org/10.1242/dev.02667>
- Loywyck, V., CASTRES, A., PROUDOM, Y., COUET, S., JULLIEN, E., 2019. Bilan du Contrôle de Performances Ovins Allaitants - Campagne 2018.
- Macias, M.J., Martin-Malpartida, P., Massagué, J., 2015. Structural determinants of Smad function in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.03.012>
- Mahieu, M., Jego, Y., Driancourt, M.A., Chemineau, P., 1989. Reproductive performances of creole and black-belly ewes in the West Indies. A new major gene controlling ovulation rate? *Animal Reproduction Science* 19, 235–243. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(89\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0378-4320(89)90097-3)
- Malher, X., Le Chère, A.K., 1998. High prolificacy in Belle-Ile sheep (Brittany, France): major effects of a putative single gene and the Awh colour gene on ovulation rate and litter size. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 473–484.
- Malpaux, B., Viguié, C., Skinner, D.C., Thiéry, J.C., Pelletier, J., Chemineau, P., 1996. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal Reproduction Science, Animal Reproduction: Research and Practice* 42, 109–117. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01505-9](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01505-9)
- Mansanet, C., 2013. Contrôle génétique et physiologique de la prolificité en race ovine lacaune : caractérisation de la mutation causale et rôle fonctionnel du gène FECL (thesis). Tours.
- Martin, J.A., Park, M.M., 1999. Trends in twin and triplet births: 1980-97. *Natl Vital Stat Rep* 47, 1–16.

- Martin, P., Raoul, J., Bodin, L., 2014. Effects of the *FecL* major gene in the Lacaune meat sheep population. *Genet. Sel. Evol.* 46, 48. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-46-48>
- Martinez-Royo, A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A., Fantova, E., Bodin, L., Mulsant, P., Serrano, M., Folch, J., Calvo, J.H., 2008. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *Animal Genetics* 39, 294–297. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01707.x>
- Martyniuk, E., Radomska, M.J., 1991. A Single Gene for Prolificacy in Olkuska Sheep., in: Elsen, J.M., Bodin, L., Thimonier, J. (Eds.), *Major Genes for Reproduction in Sheep*, INRA. Paris, pp. 85–92.
- Massagué, J., 1998. TGF- $\beta$  SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry* 67, 753–791. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.753>
- Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., Ohkura, S., 2012. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *J. Reprod. Dev.* 58, 44–50. <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>
- Mazerbourg, S., Klein, C., Roh, J., Kaivo-Oja, N., Mottershead, D.G., Korchynskyi, O., Ritvos, O., Hsueh, A.J.W., 2004. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Mol. Endocrinol.* 18, 653–665. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0393>
- McGee, E.A., Hsueh, A.J., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.* 21, 200–214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- McGrath, S.A., Esquela, A.F., Lee, S.J., 1995. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol. Endocrinol.* 9, 131–136. <https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7760846>
- McIntosh, C.J., Lawrence, S., Smith, P., Juengel, J.L., McNatty, K.P., 2012. Active immunization against the proregions of GDF9 or BMP15 alters ovulation rate and litter size in mice. *Reproduction* 143, 195–201. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0336>
- McIntosh, C.J., Lun, S., Lawrence, S., Western, A.H., McNatty, K.P., Juengel, J.L., 2008. The proregion of mouse BMP15 regulates the cooperative interactions of BMP15 and GDF9. *Biol. Reprod.* 79, 889–896. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068163>
- McNatty, K.P., Galloway, S.M., Wilson, T., Smith, P., Hudson, N.L., O'Connell, A., Bibby, A.H., Heath, D.A., Davis, G.H., Hanrahan, J.P., Juengel, J.L., 2005. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution* 37, S25. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-37-S1-S25>
- McNatty, K.P., Heath, D.A., Hudson, N.L., Lun, S., Juengel, J.L., Moore, L.G., 2009. Gonadotrophin-responsiveness of granulosa cells from bone morphogenetic protein 15 heterozygous mutant sheep. *Reproduction* 138, 545–551. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0154>
- McNatty, K.P., Henderson, K.M., 1987. Gonadotrophins, fecundity genes and ovarian follicular function. *J. Steroid Biochem.* 27, 365–373. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(87\)90329-3](https://doi.org/10.1016/0022-4731(87)90329-3)
- McNatty, K.P., Henderson, K.M., Lun, S., Heath, D.A., Ball, K., Hudson, N.L., Fannin, J., Gibb, M., Kieboom, L.E., Smith, P., 1985. Ovarian activity in Booroola x Romney ewes which have a major gene influencing their ovulation rate. *Reproduction* 73, 109–120. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0730109>
- McNatty, K.P., Hudson, N.L., Lun, S., Heath, D.A., Shaw, L., Condell, L., Phillips, D.J., Clarke, I.J., 1993. Gonadotrophin-releasing hormone and the control of ovulation rate by the *FecB* gene in Booroola ewes. *Reproduction* 98, 97–105. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0980097>
- McNatty, K.P., Hudson, N.L., Whiting, L., Reader, K.L., Lun, S., Western, A., Heath, D.A., Smith, P., Moore, L.G., Juengel, J.L., 2007. The effects of immunizing sheep with different BMP15 or GDF9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. *Biol. Reprod.* 76, 552–560. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054361>

- McNatty, K.P., Lun, S., Heath, D.A., Ball, K., Smith, P., Hudson, N.L., McDiarmid, J., Gibb, M., Henderson, K.M., 1986. Differences in ovarian activity between booroola X merino ewes which were homozygous, heterozygous and non-carriers of a major gene influencing their ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.* 77, 193–205. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0770193>
- McNatty, K.P., Moore, L.G., Hudson, N.L., Quirke, L.D., Lawrence, S.B., Reader, K., Hanrahan, J.P., Smith, P., Groome, N.P., Laitinen, M., Ritvos, O., Juengel, J.L., 2004. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128, 379–386. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00280>
- McNeilly, A.S., Crow, W., Brooks, J., Evans, G., 1992. Luteinizing hormone pulses, follicle-stimulating hormone and control of follicle selection in sheep. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 45, 5–19.
- Medan, M.S., Arai, K.Y., Watanabe, G., Taya, K., 2007. Inhibin: Regulation of reproductive function and practical use in females. *Animal Science Journal* 78, 16–27. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00399.x>
- Medan, M.S., Takedom, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Yazawa, S., Watanabe, G., Taya, K., 2006. The Effect of Active Immunization against Inhibin on Gonadotropin Secretions and Follicular Dynamics during the Estrous Cycle in Cows. *Journal of Reproduction and Development* 52, 107–113. <https://doi.org/10.1262/jrd.17064>
- Medan, M.S., Watanabe, G., Sasaki, K., Nagura, Y., Sakai, H., Fujita, M., Sharawy, S., Taya, K., 2003. Effects of passive immunization of goats against inhibin on follicular development, hormone profile and ovulation rate. *Reproduction* 125, 751–757. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250751>
- Meinsohn, M.-C., 2019. Role of the orphan nuclear receptor NR5A2 in ovarian function.
- Meyermans, R., Chantepie, L., Fabre, S., Woloszyn, F., Sarry, J., Buys, N., Bodin, L., Janssens, S., 2018. Involvement of the FecXGr mutation in the high prolificacy of the Flemish sheep breed in Belgium.
- Miyazono, K., Maeda, S., Imamura, T., 2005. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine & Growth Factor Reviews, Bone Morphogenetic Proteins* 16, 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.01.009>
- Monestier, O., Servin, B., Auclair, S., Bourquard, T., Poupon, A., Pascal, G., Fabre, S., 2014. Evolutionary origin of bone morphogenetic protein 15 and growth and differentiation factor 9 and differential selective pressure between mono- and polyovulating species. *Biol. Reprod.* 91, 83. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119735>
- Monniaux, D., 2016. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology* 86, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.017>
- Monniaux, D., Cadoret, V., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Elis, S., Fabre, S., Maillard, V., Monget, P., Uzbekova, S., 2019. Folliculogenesis, in: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier, pp. 377–398.
- Monniaux, D., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Estienne, A., Fabre, S., Mansanet, C., Monget, P., 2014. The Ovarian Reserve of Primordial Follicles and the Dynamic Reserve of Antral Growing Follicles: What Is the Link? *Biol Reprod* 90. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117077>
- Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J.-L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbiès-Tran, R., Fabre, S., 2013. Regulation of anti-Müllerian hormone production in domestic animals. *Reproduction, Fertility and Development* 25, 1. <https://doi.org/10.1071/RD12270>
- Monniaux, D., Mandon-Pépin, B., Monget, P., 1999. L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé. *médecine/sciences* 15, 157. <https://doi.org/10.4267/10608/1306>
- Monteagudo, L.V., Ponz, R., Tejedor, M.T., Laviña, A., Sierra, I., 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa

- Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science* 110, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.005>
- Montgomery, G.W., Crawford, A.M., Penty, J.M., Dodds, K.G., Ede, A.J., Henry, H.M., Pierson, C.A., Lord, E.A., Galloway, S.M., Schmack, A.E., 1993. The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nat. Genet.* 4, 410–414. <https://doi.org/10.1038/ng0893-410>
- Montgomery, G.W., Duffy, D.L., Hall, J., Haddon, B.R., Kudo, M., McGee, E.A., Palmer, J.S., Hsueh, A.J., Boomsma, D.I., Martin, N.G., 2000. Dizygotic twinning is not linked to variation at the alpha-inhibin locus on human chromosome 2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3391–3395. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6831>
- Montgomery, G.W., Galloway, S.M., Davis, G.H., McNatty, K.P., 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Reproduction* 121, 843–852.
- Montgomery, G.W., Lord, E.A., Penty, J.M., Dodds, K.G., Broad, T.E., Cambridge, L., Sunden, S.L., Stone, R.T., Crawford, A.M., 1994. The Booroola fecundity (FecB) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics* 22, 148–153. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1355>
- Montgomery, G.W., McNatty, K.P., Davis, G.H., 1992. Physiology and Molecular Genetics of Mutations that Increase Ovulation Rate in Sheep. *Endocr Rev* 13, 309–328. <https://doi.org/10.1210/edrv-13-2-309>
- Montgomery, G.W., Zhao, Z.Z., Marsh, A.J., Mayne, R., Treloar, S.A., James, M., Martin, N.G., Boomsma, D.I., Duffy, D.L., 2004. A Deletion Mutation in GDF9 in Sisters with Spontaneous DZ Twins 8.
- Montgomery, G.W., Zondervan, K.T., Nyholt, D.R., 2014. The future for genetic studies in reproduction. *Mol. Hum. Reprod.* 20, 1–14. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat058>
- Montmeas, L., Leborgne, M.C., Tanguy, J.-M., Foisseau, J.-M., Selin, I., Vergonzanne, G., Wimmer, E., 2013. *Reproduction des animaux d'élevage*. 3<sup>e</sup> édition., Educagri Editions. ed. Dijon.
- Moore, R.K., Otsuka, F., Shimasaki, S., 2003. Molecular Basis of Bone Morphogenetic Protein-15 Signaling in Granulosa Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 304–310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207362200>
- Morón, F.J., de Castro, F., Royo, J.L., Montoro, L., Mira, E., Sáez, M.E., Real, L.M., González, A., Mañes, S., Ruiz, A., 2006. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) alleles predict over-response to recombinant follicle stimulation hormone and iatrogenic ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Pharmacogenet. Genomics* 16, 485–495. <https://doi.org/10.1097/01.fpc.0000215073.44589.96>
- Morris, C.A., Day, A.M., 1990. Effects of dam and sire group on the propensity for twin calving in cattle. *Animal Science* 51, 481–488. <https://doi.org/10.1017/S0003356100012514>
- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Scheetz, D., Weber-Nielsen, M., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2017. Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. *Reproduction* 154, R1–R11. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0104>
- Mottershead, D.G., Sugimura, S., Al-Musawi, S.L., Li, J.-J., Richani, D., White, M.A., Martin, G.A., Trotta, A.P., Ritter, L.J., Shi, J., Mueller, T.D., Harrison, C.A., Gilchrist, R.B., 2015. Cumulin, an Oocyte-secreted Heterodimer of the Transforming Growth Factor- $\beta$  Family, Is a Potent Activator of Granulosa Cells and Improves Oocyte Quality. *J Biol Chem* 290, 24007–24020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671487>
- Mullen, M.P., Hanrahan, J.P., 2014. Direct Evidence on the Contribution of a Missense Mutation in GDF9 to Variation in Ovulation Rate of Finnsheep. *PLOS ONE* 9, e95251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095251>
- Mullen, M.P., Hanrahan, J.P., Howard, D.J., Powell, R., 2013. Investigation of prolific sheep from UK and Ireland for evidence on origin of the mutations in BMP15 (FecX(G), FecX(B)) and GDF9

- (FecG(H)) in Belclare and Cambridge sheep. *PLoS ONE* 8, e53172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053172>
- Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., Pisselet, C., Riquet, J., Monniaux, D., Callebaut, I., Cribiu, E., Thimonier, J., Teyssier, J., Bodin, L., Cognié, Y., Chitour, N., Elsen, J.M., 2001. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérimo ewes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5104–5109. <https://doi.org/10.1073/pnas.091577598>
- Muñoz-Gutiérrez, M., Findlay, P.A., Adam, C.L., Wax, G., Campbell, B.K., Kendall, N.R., Khalid, M., Forsberg, M., Scaramuzzi, R.J., 2005. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-1 receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction* 130, 869–881. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00557>
- Nashun, B., Hill, P.W.S., Smallwood, S.A., Dharmalingam, G., Amouroux, R., Clark, S.J., Sharma, V., Ndjetehe, E., Pelczar, P., Festenstein, R.J., Kelsey, G., Hajkova, P., 2015. Continuous Histone Replacement by Hira Is Essential for Normal Transcriptional Regulation and De Novo DNA Methylation during Mouse Oogenesis. *Molecular Cell* 60, 611–625. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.010>
- Nicol, L., Bishop, S.C., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L.-E., Rhind, S.M., McNeilly, A.S., 2009. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *REPRODUCTION* 138, 921–933. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>
- Nilsson, E.E., Schindler, R., Savenkova, M.I., Skinner, M.K., 2011. Inhibitory Actions of Anti-Müllerian Hormone (AMH) on Ovarian Primordial Follicle Assembly. *PLOS ONE* 6, e20087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020087>
- Nilsson, E.E., Skinner, M.K., 2002. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod.* 67, 1018–1024. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002527>
- Nocka, K., Majumder, S., Chabot, B., Ray, P., Cervone, M., Bernstein, A., Besmer, P., 1989. Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice—evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev.* 3, 816–826. <https://doi.org/10.1101/gad.3.6.816>
- Noguera, J.L., Rodríguez, C., Varona, L., Tomàs, A., Muñoz, G., Ramírez, O., Barragán, C., Arqué, M., Bidanel, J.P., Amills, M., Ovilo, C., Sánchez, A., 2009. A bi-dimensional genome scan for prolificacy traits in pigs shows the existence of multiple epistatic QTL. *BMC Genomics* 10, 636. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-636>
- Notter, D.R., 2008. Genetic aspects of reproduction in sheep. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2, 122–128. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01151.x>
- Otsuka, F., McTavish, K., Shimasaki, S., 2011. Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function. *Mol Reprod Dev* 78, 9–21. <https://doi.org/10.1002/mrd.21265>
- Otsuka, F., Shimasaki, S., 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. *PNAS* 99, 8060–8065. <https://doi.org/10.1073/pnas.122066899>
- Otsuka, F., Yamamoto, S., Erickson, G.F., Shimasaki, S., 2001. Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. *J. Biol. Chem.* 276, 11387–11392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010043200>
- Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G.F., Shimasaki, S., 2000. Bone Morphogenetic Protein-15: IDENTIFICATION OF TARGET CELLS AND BIOLOGICAL FUNCTIONS. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39523–39528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007428200>

- Palmer, J.S., Zhao, Z.Z., Hoekstra, C., Hayward, N.K., Webb, P.M., Whiteman, D.C., Martin, N.G., Boomsma, D.I., Duffy, D.L., Montgomery, G.W., 2006. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 4713–4716. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0970>
- Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R.T., Eppig, J.J., Thompson, T.B., Matzuk, M.M., 2013a. Reply to Mottershead et al.: GDF9:BMP15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E2258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304497110>
- Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R.T., Eppig, J.J., Thompson, T.B., Matzuk, M.M., 2013b. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E776–785. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218020110>
- Persani, L., Rossetti, R., Di Pasquale, E., Cacciatore, C., Fabre, S., 2014. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum. Reprod. Update* 20, 869–883. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu036>
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engström, U., Heldin, C.H., Funa, K., ten Dijke, P., 1998. The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett.* 434, 83–87. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00954-5](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00954-5)
- Pierre, A., Estienne, A., Racine, C., Picard, J.-Y., Fanchin, R., Lahoz, B., Alabart, J.L., Folch, J., Jarrier, P., Fabre, S., Monniaux, D., di Clemente, N., 2016. The Bone Morphogenetic Protein 15 Up-Regulates the Anti-Müllerian Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 2602–2611. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-4066>
- Pierre, A., Pisselet, C., Dupont, J., Mandon-Pépin, B., Monniaux, D., Monget, P., Fabre, S., 2004. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 805–817. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01545>
- Piper, L.R., Bindon, B.M., 1982. Genetic segregation for fecundity in Booroola Merino sheep.
- Polley, S., De, S., Batabyal, S., Kaushik, R., Yadav, P., Arora, J.S., Chattopadhyay, S., Pan, S., Brahma, B., Datta, T.K., Goswami, S.L., 2009. Polymorphism of fecundity genes (BMPR1B, BMP15 and GDF9) in the Indian prolific Black Bengal goat. *Small Ruminant Research* 85, 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.08.004>
- Quirk, S.M., Cowan, R.G., Joshi, S.G., Henrikson, K.P., 1995. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/luteal cells. *Biol. Reprod.* 52, 279–287. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.279>
- Quirke, J.F., 1981. Regulation of puberty and reproduction in female lambs: A review. *Livestock Production Science* 8, 37–53. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(81\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0301-6226(81)90029-4)
- Raoul, J., 2017. Utilisation d'un panel SNPs très basse densité dans les populations en sélection de petits ruminants. INPT, Toulouse.
- Reader, K.L., Haydon, L.J., Littlejohn, R.P., Juengel, J.L., McNatty, K.P., 2012. Booroola BMPR1B mutation alters early follicular development and oocyte ultrastructure in sheep. *Reproduction, Fertility and Development* 24, 353. <https://doi.org/10.1071/RD11095>
- Reader, K.L., Heath, D.A., Lun, S., McIntosh, C.J., Western, A.H., Littlejohn, R.P., McNatty, K.P., Juengel, J.L., 2011. Signalling pathways involved in the cooperative effects of ovine and murine GDF9+BMP15-stimulated thymidine uptake by rat granulosa cells. *Reproduction* 142, 123–131. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0490>
- Regan, S.L.P., McFarlane, J.R., O'Shea, T., Andronicos, N., Arfuso, F., Dharmarajan, A., Almahbobi, G., 2015. Flow cytometric analysis of FSHR, BMRR1B, LHR and apoptosis in granulosa cells



- and ovulation rate in merino sheep. *REPRODUCTION* 150, 151–163. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0581>
- Rempel, L.A., Nonneman, D.J., Wise, T.H., Erkens, T., Peelman, L.J., Rohrer, G.A., 2010. Association analyses of candidate single nucleotide polymorphisms on reproductive traits in swine. *J. Anim. Sci.* 88, 1–15. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1985>
- Roa, J., Navarro, V.M., Tena-Sempere, M., 2011. Kisspeptins in reproductive biology: consensus knowledge and recent developments. *Biol. Reprod.* 85, 650–660. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091538>
- Robinson, T.J., 1951. The control of fertility in sheep Part II. The augmentation of fertility by gonadotrophin treatment of the ewe in the normal breeding season. *The Journal of Agricultural Science* 41, 6–63. <https://doi.org/10.1017/S0021859600058536>
- Rochus, C.M., Tortereau, F., Plisson-Petit, F., Restoux, G., Moreno-Romieux, C., Tosser-Klopp, G., Servin, B., 2018. Revealing the selection history of adaptive loci using genome-wide scans for selection: an example from domestic sheep. *BMC Genomics* 19. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4447-x>
- Russel, A.J.F., Alexieva, S.A., Elston, D.A., 1997. The effect of the introduction of the Thoka gene for fecundity on lamb production from Cheviot ewes. *Animal Science* 64, 503–507. <https://doi.org/10.1017/S135772980001612X>
- Russel, A.J.F., Doney, J.M., Gunn, R.G., 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science* 72, 451–454. <https://doi.org/10.1017/S0021859600024874>
- Ryan, K.D., Goodman, R.L., Karsch, F.J., Legan, S.J., Foster, D.L., 1991. Patterns of Circulating Gonadotropins and Ovarian Steroids during the First Perioovulatory Period in the Developing Sheep. *Biol Reprod* 45, 471–477. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.3.471>
- Sabo, 2011. Remyelination Is Altered by Bone Morphogenic Protein Signaling in Demyelinated Lesions | *Journal of Neuroscience* [WWW Document]. URL <http://www.jneurosci.org/content/31/12/4504.long> (accessed 5.17.19).
- Saumande, J., Procureur, R., Chupin, D., 1984. Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology* 21, 727–731. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90018-9)
- Scheet, P., Stephens, M., 2006. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 629–644. <https://doi.org/10.1086/502802>
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O’Rahilly, S., Carlton, M.B.L., Crowley, W.F., Aparicio, S.A.J.R., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N. Engl. J. Med.* 349, 1614–1627. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>
- Sengle, G., Ono, R.N., Sasaki, T., Sakai, L.Y., 2011. Prodomains of Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) Superfamily Members Specify Different Functions: EXTRACELLULAR MATRIX INTERACTIONS AND GROWTH FACTOR BIOAVAILABILITY\*. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 5087. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.188615>
- Shackell, G.H., Hudson, N.L., Heath, D.A., Lun, S., Shaw, L., Condell, L., Blay, L.R., McNatty, K.P., 1993. Plasma gonadotropin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene (FecX1) on the X chromosome that influences ovulation rate. *Biol. Reprod.* 48, 1150–1156. <https://doi.org/10.1095/biolreprod48.5.1150>
- Shimasaki, S., Moore, R.K., Erickson, G.F., Otsuka, F., 2003. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reprod. Suppl.* 61, 323–337.

- Shimasaki, S., Zachow, R.J., Li, D., Kim, H., Iemura, S., Ueno, N., Sampath, K., Chang, R.J., Erickson, G.F., 1999. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7282–7287. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7282>
- Silva, B.D.M., Castro, E.A., Souza, C.J.H., Paiva, S.R., Sartori, R., Franco, M.M., Azevedo, H.C., Silva, T. a. S.N., Vieira, A.M.C., Neves, J.P., Melo, E.O., 2010. A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep. *Animal Genetics* 42, 89–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x>
- Silva, G.M. da, Diniz, A.L.D., Bernardino Neto, M., Marcolini, T.T., Perillo, L.C.A., Pires, W. de P., Pessoa, S.M., 2014. Número de folículos antrais e o sucesso da fertilização in vitro: uma análise multivariada. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 36, 473–479. <https://doi.org/10.1590/S0100-720320140005046>
- Smith, P., Hudson, N.L., Corrigan, K.A., Shaw, L., Smith, T., Phillips, D.J., McNatty, K.P., 1996. Effects of the Booroola gene (FecB(B)) on bodymass, testis development and hormone concentrations during fetal life. *J. Reprod. Fertil.* 108, 253–261. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080253>
- Souza, C.J., Campbell, B.K., Webb, R., Baird, D.T., 1997. Secretion of inhibin A and follicular dynamics throughout the estrous cycle in the sheep with and without the Booroola gene (FecB). *Endocrinology* 138, 5333–5340. <https://doi.org/10.1210/endo.138.12.5627>
- Souza, C.J., MacDougall, C., MacDougall, C., Campbell, B.K., McNeilly, A.S., Baird, D.T., 2001. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRII) gene. *J. Endocrinol.* 169, R1-6.
- Souza, C.J.H., McNeilly, A.S., Benavides, M.V., Melo, E.O., Moraes, J.C.F., 2014. Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Anim. Genet.* 45, 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- Souza, C.J.H. de, Melo, E.O., Moraes, J.C.F., 2009. Genetics of prolificacy and its application to sheep production. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 33, 163–166.
- Su, Y.-Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., Eppig, J.J., 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development* 135, 111–121. <https://doi.org/10.1242/dev.009068>
- Sugiura, K., Pendola, F.L., Eppig, J.J., 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev. Biol.* 279, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.027>
- Suto, J., 2015. Genetic analysis of litter size in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 353–358. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0350>
- Takedomi, T., Kishi, H., Medan, M.S., Aoyagi, Y., Konishi, M., Itoh, T., Yazawa, S., Watanabe, G., Taya, K., 2005. Active Immunization against Inhibin Improves Superovulatory Response to Exogenous FSH in Cattle. *Journal of Reproduction and Development* 51, 341–346. <https://doi.org/10.1262/jrd.16055>
- Tannetta, D.S., Feist, S.A., Bleach, E.C., Groome, N.P., Evans, L.W., Knight, P.G., 1998. Effects of active immunization of sheep against an amino terminal peptide of the inhibin alpha C subunit on intrafollicular levels of activin A, inhibin A and follistatin. *J. Endocrinol.* 157, 157–168. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1570157>
- ten Dijke, P., Miyazono, K., Heldin, C.-H., 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- $\beta$  signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 64–70. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01519-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01519-4)

- Thimonier, J., Mauléon, P., 1969. ET DES ACTIVITÉS OVARIENNE ET HYPOPHYSIAIRE CHEZ LES OVINS. *Ann. Biol. anim. Biophys, Annales de Biologie animale* 9, 233–250.
- Thomas, N., Venkatachalapathy, T., Aravindakshan, T., Raghavan, K.C., 2016. Molecular cloning, SNP detection and association analysis of 5' flanking region of the goat IGF1 gene with prolificacy. *Anim. Reprod. Sci.* 167, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.016>
- Thompson, J., Meyer, H., 1994. Body condition scoring of sheep 4.
- Tomás, A., Frigo, E., Casellas, J., Ramírez, O., Ovilo, C., Noguera, J.L., Sánchez, A., 2006. An association study between polymorphisms of the porcine bone morphogenetic protein receptor type1beta(BMPR1B) and reproductive performance of Iberian x Meishan F2 sows. *Anim. Genet.* 37, 297–298. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01456.x>
- Torres-Rovira, L., Gonzalez-Bulnes, A., Succu, S., Spezzigu, A., Manca, M.E., Leoni, G.G., Sanna, M., Pirino, S., Gallus, M., Naitana, S., Berlinguer, F., 2014. Predictive value of antral follicle count and anti-Müllerian hormone for follicle and oocyte developmental competence during the early prepubertal period in a sheep model. *Reproduction, Fertility and Development* 26, 1094. <https://doi.org/10.1071/RD13190>
- Torres-Rovira, L., Succu, S., Pasciu, V., Manca, M.E., Gonzalez-Bulnes, A., Leoni, G.G., Pennino, M.G., Spezzigu, A., Gallus, M., Dattena, M., Monniaux, D., Naitana, S., Berlinguer, F., 2016. Postnatal pituitary and follicular activation: a revisited hypothesis in a sheep model. *Reproduction* 151, 215–225. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0316>
- Uenoyama, Y., Inoue, N., Nakamura, S., Tsukamura, H., 2019. Central Mechanism Controlling Pubertal Onset in Mammals: A Triggering Role of Kisspeptin. *Front. Endocrinol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00312>
- Våge, D.I., Husdal, M., Kent, M.P., Klemetsdal, G., Boman, I.A., 2013. A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep. *BMC Genet.* 14, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-1>
- Valasi, I., Fthenakis, G.C., Prassinou, N.N., Menegatos, I., Grigoropoulou, V., Deligiannis, C., Vainas, E., Amiridis, G.S., 2009. The effect of repeated follicular aspiration on the onset of puberty and growth rate of winter- or autumn-born lambs. *Small Ruminant Research* 84, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.05.002>
- Valasi, I., Menegatos, I., Papanikolaou, Th., Goulas, P., Amiridis, G.S., 2006. Oocyte pick-up in juvenile lambs affects neither onset of puberty nor their future fertility. *Theriogenology* 66, 2144–2151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.001>
- Valera, E., Isaacs, M.J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J.C., Choe, S., 2010. BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 5, e11167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011167>
- Van der Auwera, G.A., Carneiro, M.O., Hartl, C., Poplin, R., del Angel, G., Levy-Moonshine, A., Jordan, T., Shakir, K., Roazen, D., Thibault, J., Banks, E., Garimella, K.V., Altshuler, D., Gabriel, S., DePristo, M.A., 2013. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics* 11, 11.10.1-11.10.33. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1110s43>
- Vera, M., Aguion, M., Bouza, C., 2018. Detection of Grivette BMP15 prolificacy variant (FecX) in different sheep breeds presented in Galicia (NW Spain). *Gene Reports* 12, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.06.008>
- Vilment, J., Mugnier, S., Burg, C., 2018. « Gestion d'un gène majeur de prolificité en race ovine Lacaune viande à OVI-TEST ».
- Vinet, A., Drouilhet, L., Bodin, L., Mulsant, P., Fabre, S., Phocas, F., 2012. Genetic control of multiple births in low ovulating mammalian species. *Mamm. Genome* 23, 727–740. <https://doi.org/10.1007/s00335-012-9412-4>

- Vitt, U.A., Hayashi, M., Klein, C., Hsueh, A.J., 2000. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol. Reprod.* 62, 370–377. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.370>
- Vitt, U.A., Hsu, S.Y., Hsueh, A.J.W., 2001. Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules. *Mol Endocrinol* 15, 681–694. <https://doi.org/10.1210/mend.15.5.0639>
- Vitt, U.A., Mazerbourg, S., Klein, C., Hsueh, A.J.W., 2002. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol. Reprod.* 67, 473–480. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.2.473>
- Walkden-Brown, S.W., van der Werf, J.H.J., Nimbkar, C., Gupta, V.S. (Eds.), 2009. Use of the FecB (Booroola) gene in sheep-breeding programs: proceedings of the Helen Newton Turner Memorial International Workshop held in Pune, Maharashtra, India, 10-12 November 2008, ACIAR Proceeding. ed. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, A.C.T.
- Wan, Q., Wang, Y., Wang, H., 2015. Identification and Analysis of Regulatory Elements in Porcine Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Promoter. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 25759–25772. <https://doi.org/10.3390/ijms161025759>
- Wang, A., Hu, X., Li, N., Wu, C., 2003. Characterization of three single nucleotide polymorphisms in the porcine BMP15 gene. *Anim. Genet.* 34, 305–306.
- Wang, T., Li, B.Y., Danielson, P.D., Shah, P.C., Rockwell, S., Lechleider, R.J., Martin, J., Manganaro, T., Donahoe, P.K., 1996. The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86, 435–444. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80116-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80116-6)
- Wang, W., Liu, S., Li, F., Pan, X., Li, C., Zhang, X., Ma, Y., La, Y., Xi, R., Li, T., 2015. Polymorphisms of the Ovine BMPR-IB, BMP-15 and FSHR and Their Associations with Litter Size in Two Chinese Indigenous Sheep Breeds. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 11385–11397. <https://doi.org/10.3390/ijms160511385>
- Webb, R., Buratini, J., Hernandez-Medrano, J.H., Gutierrez, C.G., Campbell, B.K., 2016. Follicle development and selection: past, present and future. *Animal Reproduction* 13, 234–249. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR883>
- Wei, L.-N., Huang, R., Li, L.-L., Fang, C., Li, Y., Liang, X.-Y., 2014. Reduced and delayed expression of GDF9 and BMP15 in ovarian tissues from women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 31, 1483–1490. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0319-8>
- Weiskirchen, R., Meurer, S.K., Gressner, O.A., Herrmann, J., Borkham-Kamphorst, E., Gressner, A.M., 2009. BMP-7 as antagonist of organ fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 4992–5012.
- Wiater, E., Vale, W., 2003. Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 7934–7941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209710200>
- Wilson, T., Wu, X.Y., Juengel, J.L., Ross, I.K., Lumsden, J.M., Lord, E.A., Dodds, K.G., Walling, G.A., McEwan, J.C., O'Connell, A.R., McNatty, K.P., Montgomery, G.W., 2001. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.* 64, 1225–1235.
- Wu, P., Yang, Q., Wang, K., Zhou, J., Ma, J., Tang, Q., Jin, L., Xiao, W., Jiang, A., Jiang, Y., Zhu, L., Li, X., Tang, G., 2018. Single step genome-wide association studies based on genotyping by sequence data reveals novel loci for the litter traits of domestic pigs. *Genomics* 110, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.09.009>

- Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J., Matzuk, M.M., 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol.* 15, 854–866. <https://doi.org/10.1210/mend.15.6.0662>
- Yi, S.E., LaPolt, P.S., Yoon, B.S., Chen, J.Y., Lu, J.K., Lyons, K.M., 2001. The type I BMP receptor Bmpr1B is essential for female reproductive function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7994–7999. <https://doi.org/10.1073/pnas.141002798>
- Zhang, C., Liu, Y., Huang, K., Zeng, W., Xu, D., Wen, Q., Yang, L., 2011. The association of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in growth hormone (GH) gene with litter size and superovulation response in goat-breeds. *Genet Mol Biol* 34, 49–55. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000110>
- Zhang, L.-P., Gan, Q.-F., Zhang, X.-H., Li, H.-D., Hou, G.-Y., Li, J.-Y., Gao, X., Ren, H.-Y., Chen, J.-B., Xu, S.-Z., 2009. Detecting a deletion in the coding region of the bovine bone morphogenetic protein 15 gene (BMP15). *J. Appl. Genet.* 50, 145–148. <https://doi.org/10.1007/BF03195665>
- Zhang, Y., Du, H., Chen, J., Yang, G., Zhang, X., 2008. Porcine growth differentiation factor 9 gene polymorphisms and their associations with litter size. *J Genet Genomics* 35, 163–169. [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(08\)60022-3](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(08)60022-3)
- Zhang, Z., Liu, Q., Di, R., Hu, W., Wang, X., He, X., Ma, L., Chu, M., 2019. Single nucleotide polymorphisms in BMP2 and BMP7 and the association with litter size in Small Tail Han sheep. *Animal Reproduction Science* 204, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.04.001>
- Zhao, X., Yang, Q., Zhao, K., Jiang, C., Ren, D., Xu, P., He, X., Liao, R., Jiang, K., Ma, J., Xiao, S., Ren, J., Xing, Y., 2016. Production of Transgenic Pigs with an Introduced Missense Mutation of the Bone Morphogenetic Protein Receptor Type IB Gene Related to Prolificacy. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 29, 925–937. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0505>
- Zhou, M., Pan, Z., Cao, X., Guo, X., He, X., Sun, Q., Di, R., Hu, W., Wang, X., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, C., Liu, Q., Chu, M., 2018. Single Nucleotide Polymorphisms in the HIRA Gene Affect Litter Size in Small Tail Han Sheep. *Animals (Basel)* 8. <https://doi.org/10.3390/ani8050071>



# Liste des publications

## Publications

Chantepie L, Bodin L, Sarry J, Woloszyn F, Ruesche J, Drouilhet L and Fabre S (2018) **Presence of causative mutations affecting prolificacy in the Noire du Velay and Mouton Vendéen sheep breeds.** *Livestock Science* 216, 44-50

Chantepie L, Bodin L, Sarry J, Woloszyn F, Plisson-Petit F, Ruesche J, Drouilhet L and Fabre S **Genome-wide identification of a regulatory mutation in BMP15 controlling prolificacy in sheep.** (Soumis dans *Plos Genetic*)

Calvo J.H., Chantepie L, Serrano M, Sarto M.P., Iguacel L.P., Jiménez M.A., Alabart J.L., Folch J., Fabre S, Lahoz B, **A new allele in the BMP15 gene (FecXRA) that affects prolificacy co-segregates with FecXR and FecXGr in Rasa aragonesa sheep.** (Soumis dans *Theriogenology*)

## Communications

### *Orale*

Chantepie, L., Bordes, A., Aletru, M., Burg, C., Debat, F., Rialland, F., Rivemale, F., Tadi, N., Alabart, J. L., Lahoz-Crespo, B., Fabre, S. (2018). **Search for a pleiotropic effect of the FecLL prolific mutation in Lacaune meat sheep.** In: Proceedings of the 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR). Cordoba, ESP (2018-09-27 - 2018-09-29).

Fabre, S., Lahoz, B., Chantepie, L., Fatet, A., Alabart, J., Monniaux, D. (2018). **Relationship between circulating AMH and puberty, fertility and prolificacy of small ruminants.** In: Proceedings of the 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) (p. 82-82). *Reproduction in Domestic Animals*, 53 (Suppl. 2). Cordoba, ESP (2018-09-27 - 2018-09-29).

Chantepie, L., Bodin, L., Woloszyn, F., Sarry, J., Fabre, S. (2017). **Identification of two major genes affecting prolificacy in the French Noire du Velay sheep.** Presented at 36. Conference of the International Society for Animal Genetics (ISAG), Dublin, IRL (2017-07-16 - 2017-07-21).

*Poster*

Chantepie, L., Serrano, M., Sarto, M. P., Iguacel, L., Jiménez, M., Alabart, J. L., Folch, J., Lahoz, B., Fabre, S., Calvo, J. H. (2019). **Genome-wide association study (GWAS) identifies the FecXGr allele in BMP15 segregating in Rasa Aragonesa sheep breed.** Presented at 37. International Society for Animal Genetics Conference (ISAG), Lleida, ESP (2019-07-07 - 2019-07-12).

Chantepie, L., Drouilhet, L., Genet, C., Plisson-Petit, F., Sarry, J., Tosser-Klopp, G., Woloszyn, F., Fabre, S. (2019). **Identification of a new mutation responsible for epidermolysis bullosa in Mouton Vendéen sheep.** Presented at 37. International Society for Animal Genetics Conference (ISAG), Lleida, ESP (2019-07-07 - 2019-07-12).

Meyermans, R., Chantepie, L., Fabre, S., Woloszyn, F., Sarry, J., Buys, N., Bodin, L., Janssens, S. (2017). **Involvement of the FecXGr mutation in the high prolificacy of the Flemish sheep breed in Belgium.** In: Book of Abstracts of the 68th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (p. 162-162). Annual Meeting of the European Association for Animal Production, 23 (1ère Ed.). (EAAP), Tallinn, EST (2017-08-28 - 2017-09-01)



# Liste des abréviations

**ADN**: Acide désoxyribonucléique  
**ADNc**: ADN complémentaire  
**AMH**: Hormone anti-Müllérienne  
**B4GALNT2**: Beta-1,4-N-Acetyl-Galactosaminyl  
Transferase 2  
**BAMBI**: BMP and Activin Membrane Bound  
Inhibitor  
**BMP**: Bone Morphogenetic Protein  
**BMP15**: Bone Morphogenetic Protein 15  
**BMPR1B**: Bone Morphogenetic Protein Receptor  
type 1B  
**Co-SMAD**: Common Smad  
**CYP19**: Aromatase  
**DAN family**: Deadenylating Nuclease  
**E2**: Oestradiol  
**EMSA**: Electrophoretic Mobility Shift Assay  
**Fec**: Fecundity gene  
**FSH**: Folliculostimulating Hormone  
**GDF9**: Growth and Differentiation Factor 9  
**GWAS**: Genome Wide Association Study  
**HIRA**: Histone Cell Cycle Regulator  
**IGF**: Insulin-like Growth Factor  
**IGF2BP1**: Insulin-Like Growth Factor 2 mRNA  
Binding Protein 1  
**INH**: Inhibine  
**I-SMAD**: Inhibitory Smad  
**KISS1**: KiSS-1 Metastasis-Suppressor  
**LH**: Luteinizing Hormone  
**LHCGR**: Luteinizing Hormone/choriogonadotropin  
- Receptor  
**OAR**: Ovis Aries  
**P4**: Progestérone  
**PCR**: Polymérase Chain Reaction  
**RFLP**: Restriction Fragment Length Polymorphism  
**R-SMAD**: Receptor Regulated SMAD  
**SNP**: Single nucleotide polymorphism  
**TGF  $\beta$**  : Transforming Growth Factor Beta



# Liste des figures

Figure 1: Place de la France au niveau Européen et Mondial sur la production de viande ovine. __	13
Figure 2: Évolution du cheptel de brebis et de la productivité numérique en France entre 1990 et 2013. _____	13
Figure 3: Théorie de l'existence d'un gène majeur, distribution bimodale des performance. _____	4
Figure 4: Carte génétique du chromosome 6 ovine et localisation de FecB. _____	5
Figure 5: Cartes génétique et physique de la région FecB localisée sur le chromosome 6 ovine. ____	7
Figure 6: Carte génétique de FecX <sup>L</sup> sur le chromosome X. _____	8
Figure 7: Caractéristiques de la mutation Thoka de GDF9 dans la race Icelandic. _____	9
Figure 8: Carte génétique du locus FecL sur le chromosome 11 ovine en comparaison avec le chromosome 17 humain. _____	10
Figure 9: Localisation de la mutation FecL <sup>L</sup> sur le chromosome 11 ovine. _____	180
Figure 10: Résultats d'analyses d'association à l'échelle du génome et du chromosome X pour les mutations FecX <sup>Gr</sup> et FecX <sup>O</sup> . _____	13
Figure 11: Séquence protéique de GDF9 et positions des substitutions créées par des SNPs. ____	15
Figure 12: Graphique d'association entre les SNPs du chromosome 5 et la taille de portée sur dans la race Norwegian White Sheep. _____	16
Figure 13: Substitutions et Insertions/délétions dans la protéine GDF9 humaine associées à une augmentation de la fréquence de gémellité dizygotique. _____	23
Figure 14: Substitutions, et Insertions/délétions dans les protéines BMP15 et GDF9 humaine associées aux syndromes ovariens chez la femme. _____	23
Figure 15: Arbre phylogénétique des ligands de la super famille du TGF-β. _____	26
Figure 16: Représentation schématique de la structure protéique primaire des BMPs. _____	26
Figure 17: Voie de signalisation des BMPs et ses régulations. _____	27
Figure 18 : Arbre phylogénétique des gènes codants les protéines SMADs. _____	28
Figure 19: Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation ovocytaire. ____	30
Figure 20: Folliculogenèse chez la brebis. _____	31
Figure 21: Sécrétions hormonales au cours du cycle oestrien de la brebis. _____	32
Figure 22: Vagues folliculaire dans les stades terminaux de la croissance folliculaire chez les ruminants. _____	34
Figure 23: Puberté des agnelles sous lumière naturelle en fonction du mois de naissance. _____	34
Figure 24: Rôle des neurones KNDY dans l'apparition de la puberté. _____	34
Figure 25: Variations annuelles de la fréquence du comportement d'œstrus (●) et de l'ovulation (Δ) chez la brebis. _____	35
Figure 26: Schématisation de l'activité sexuelle saisonnière chez la brebis. _____	35

Figure 27: Contrôle de la saisonnalité de la reproduction chez la brebis. _____	35
Figure 28: Facteurs de la famille du TGFβ impliqués dans les communications bidirectionnelles entre les cellules de la thèque, de la granulosa et l'ovocyte. _____	36
Figure 29: Illustration schématique des variantes connues de BMP15 identifiées chez les ovins avec des altérations du nombre d'ovulations et de la fertilité. _____	38
Figure 30: Tractus génitaux de brebis Romney sauvage et Inverdale. _____	38
Figure 31: Coupes histologiques d'ovaires homozygotes Fec <sup>L</sup> /Fec <sup>L</sup> . _____	39
Figure 32: Illustration schématique des variants connus de GDF9 identifiés chez les ovins avec des altérations du nombre d'ovulations, de la prolificité ou de la fertilité. _____	40
Figure 33: Coupes immunohistologiques de follicules en croissance basale dans des ovaires de brebis sauvages ou porteuses de mutations dans BMP15 ou GDF9. _____	40
Figure 34: Principales étapes du développement folliculaire et de la maturation et conséquences des mutations des gènes de prolificité sur la folliculogénèse et le nombre d'ovulations chez la brebis. _____	42
Figure 35: Relations fonctionnelles entre BMP15, GDF9 et BMP1B. _____	42
Figure 36: Modèle moléculaire du contrôle du nombre d'ovulations par les différentes mutations de prolificité dans BMP15 et GDF9. _____	43
Figure 37: Expression des éléments du système inhibine/activine aux différents stades de développement des follicules et du corps jaune. _____	46
Figure 38: Évolution de la prolificité d'un'ensemble de race ovines françaises entre 1986 et 2016 d'après les données de la base OVAL. _____	48
Figure 39: Distribution de la répétabilité des performances de prolificité intra-père en race Ile de France. _____	49
Figure 40: Représentation graphique de la relation entre la moyenne et de la variance de la taille de la portée pour 35 races ovines. _____	52
Figure 41: Pourcentage de portées extrêmes dans différentes races françaises. _____	53
Figure 42: Représentation graphique de la relation entre la moyenne et de la variance de la taille de la portée pour 30 races ovines sans prise en compte des cinq races porteuses d'une mutation identifiée dans les gènes Fec. _____	60
Figure 43: Chromatogramme de séquençage visualisant la mutation c.907 C>A (Fec <sup>If</sup> ) dans la race Ile-de-France. _____	60
Figure 44: Représentation de l'effet probable de la mutation p.Q303K en race Ile de France sous PolyPhen-2. _____	61
Figure 45: Résultats d'une PCR-RLFP pour la mutation Fec <sup>If</sup> en race Ile-de-France. _____	61
Figure 46: Représentation graphique de la relation entre la moyenne et de la variance de la taille de la portée pour 30 races ovines sans prise en compte des cinq races porteuses d'une mutation identifiée dans les gènes Fec. _____	63

Figure 47: Chromatogramme du séquençage de la mutation c.395 C>T (FecX <sup>C</sup> ) dans la race Causse du Lot.	63
Figure 48: Représentation de l'effet probable de la mutation p. A132V en race Causse du Lot sous PolyPhen 2.	63
Figure 49: Résultats du génotypage de la mutation FecX <sup>C</sup> par PCR-RFLP par l'enzyme HinfI.	63
Figure 50: Distribution de la taille de portée des brebis Noire du Velay non porteuses de la mutation FecL <sup>L</sup> .	68
Figure 51: Résultat de l'analyse d'association pour la race Noire du Velay au niveau génomique et chromosomique.	70
Figure 52: Reconstruction de l'haplotype causale au locus OARX.	70
Figure 53: Région de localisation probable de la mutation sur le chromosome X ovin.	70
Figure 54: Résultats d'un test de génotypage de FecX <sup>N</sup> par PCR-RFLP.	72
Figure 55: Résultat d'association à l'échelle du génome intégrant le SNP OARX:50977717 T>A.	72
Figure 56: Effet estimé de FecX <sup>N</sup> en race Noire du Velay et Blanche du Massif Central	73
Figure 57: Localisation de FecX <sup>N</sup> dans la région en amont de BMP15.	73
Figure 58: Résultat du Western Blot pour la protéine BMP15 mutante et sauvage produite in vitro.	74
Figure 59: Quantification de la protéine BMP15 produite in vitro.	74
Figure 60: Effet fonctionnel de la mutation FecX <sup>N</sup> sur l'activité du promoteur BMP15	74
Figure 61: Effet de la mutation FecX <sup>N</sup> sur l'expression de BMP15 et de GDF9 dans l'ovocyte ovin.	75
Figure 62: Résultat de l'analyse d'association pour la race Rasa Aragonesa au niveau génomique et chromosomique.	87
Figure 63: Structure des populations de mouton français.	90
Figure 64: Conservation des acides aminés de la protéine BMP15 entre les position p.83-163 de plusieurs espèces.	92
Figure 65: Prédiction des mutations FecX sur l'effet fonctionnel de la protéine BMP15 par PolyPhen-2.	93
Figure 66: Conservation des acides aminés de la protéine BMP15 de la région p.223-335 de plusieurs espèces.	95
Figure 67: Représentation 3D de la protéine BMP15 et localisation de la mutation p.Q303K.	95
Figure 68 : Position du site consensus de liaison des facteurs LHX8, NOBOX, PTIX1 et TBP en regard de la mutation FecX <sup>N</sup> .	97
Figure 69: Retard sur gel d'un fragment de PCR incluant FecX <sup>N</sup> en présence d'extraits nucléaires ou cytoplasmiques de cellules CHO.	97
Figure 70: Effet du mode de naissance sur le poids de naissance.	102
Figure 71: Effet du génotype FecL <sup>L</sup> par mode de naissance sur le poids de naissance.	102

Figure 72: Croissance des agnelles entre 0 et 8 mois en fonction du mode de naissance. _____	102
Figure 73: Croissance des agnelles entre 0 et 8 mois en fonction de leur génotype au locus FeCL_	102
Figure 74: Évolution du poids en fonction du mode d'allaitement chez les agnelles nées multiples. _____	104
<hr/>	
Figure 75: Dosage de P4 en fonction du génotype au locus L chez des agnelles Lacaune entre 0 et 8 mois. _____	104
Figure 76: Dosage de P4 en fonction du génotype au locus L et de la précocité, chez des agnelles Lacaunes entre 0 et 8 mois. _____	104
Figure 77: Courbes générales de l'AMH et de la FSH entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune.	105
Figure 78: Évolution de la concentration plasmatique de FSH entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+ _____	105
Figure 79: Évolution de la concentration plasmatique d'AMH entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+ _____	105
Figure 80: Évolution de la concentration plasmatique d'InhA entre 0 et 6 mois chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+ _____	106
Figure 81: Détection de l'œstrus par les béliers en pourcentage cumulé chez des agnelles Lacaune +/+ et L/+. _____	106
Figure 82: Évolution des concentrations plasmatiques de LH au cours d'un cycle oestrien synchronisé chez les brebis Lacaune. _____	109
Figure 83: Évolution des concentrations plasmatiques de FSH au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune _____	109
Figure 84: Évolution de la concentration plasmatique de AMH au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune. _____	109
Figure 85: Évolution de la concentration plasmatique de InhA au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune +/+ et L/+. _____	109
Figure 86 : Évolution de la concentration plasmatique de P4 au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune +/+ et L/+. _____	109
Figure 87 : Effet dose de PSMG sur la LH en fonction des génotype sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune +/+ et L/+. _____	109
Figure 88 : Effet dose de PSMG sur la FSH en fonction du génotype sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune +/+ et L/+. _____	110
Figure 89 : Effet dose de PSMG sur l'AMH en fonction du génotype sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune +/+ et L/+. _____	110
Figure 90 : Effet dose de PSMG sur la P4 en fonction du génotype sur le moment du pic de LH chez des brebis Lacaune +/+ et L/+. _____	110

Figure 91: Effet de différentes doses de PMSG sur le nombre d'ovulations chez des brebis Lacaune +/+ et L/+.	111
Figure 92 : Diagnostic de gestation et fertilité en installation expérimentale chez des brebis Lacaune +/+ et L/+.	111
Figure 93 : Profils de la concentration circulante de progestérone (P4) d'agnelles L/+ précoces et cycliques.	114
Figure 94: Évolution des concentrations plasmatiques d'E2, LH, FSH et de P4 au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez les brebis Lacaune +/+ et L/L.	118
Figure 95: Evolution des concentrations plasmatiques d'AMH au cours d'un cycle œstrien synchronisé chez des brebis Lacaune +/+ et L/L.	118
Figure 96: Principe du génotypage KASPar allèle spécifique	145
Figure 97: Résultats de génotypage de la mutation FecX <sup>Gr</sup> par PCR-KASPar	156
Figure 98: Comparaison des protocoles d'incorporation et de détection utilisant des acides aminés radiomarqués ou biotinylés.	163
Figure 99: Principe du retard sur gel.	165
Figure 100: Frise chronologique du protocole expérimental de prise de sang, pesée et NEC de la naissance à la puberté.	167
Figure 101 : Coupe transversale au niveau des lombaires schématisant les différentes notes de NEC chez l'ovin.	169





# Liste des tableaux

Tableau 1: Pondérations économiques et écarts-types génétiques des caractères d'intérêt en élevage ovin. ....	1
Tableau 2 : Polymorphismes dans GDF9 et BMP15 dans les races Cambridge et Belclare. ....	15
Tableau 3: Localisation chromosomique des QTLs et SNPs associés aux taux de gemellité et au nombre d'ovulations chez les bovins. ....	22
Tableau 4: Nom et fonction connue des protéines montrant une glycosylation atypique, présentes uniquement dans le liquide folliculaire ovarien de brebis homozygotes $FecL^L$ . ....	45
Tableau 5: Gènes majeurs de prolificité et leurs mutations chez les ovins. ....	47
Tableau 6: Extraction de données de prolificité de la base OVALL pour des brebis Lacaune non porteuses des mutations $FecX^L$ et $FecL^L$ . ....	49
Tableau 7: Répartition des tailles de portée en 2018 en race Noire du Velay et Mouton Vendéen. ....	53
Tableau 8: Nombre d'animaux (Noire du Velay et Mouton Vendéen) et moyenne de prolificité utilisé pour l'approche mutation candidate. ....	54
Tableau 9: Résultats de génotypage des mutations $FecL^L$ , $FecX^L$ et $FecX^{Gr}$ pour les brebis Noire du Velay et Mouton Vendéen de prolificité extrêmes. ....	54
Tableau 10: Fréquence des génotypes aux loci $FecL$ et $FecX$ et prolificité associée en Noire du Velay et Mouton Vendéen. ....	55
Tableau 11: <i>Tableau de contingence des génotypes pour la mutation <math>FecX^{Jf}</math> en race Ile-de-France.</i> ....	61
Tableau 12: Tableau de contingence pour la mutation $FecX^C$ en race Causse du Lot (échantillons DEGERAM). ....	64
Tableau 13: Tableau de contingence pour la mutation $FecX^C$ en race Causse du Lot (population). ....	64
Tableau 14: Effectifs des animaux séquencés tout génome par race. ....	66
Tableau 15: Fréquence et effet de la mutation $FecG^E$ dans la population Martinik Black Belly de la station expérimentale de l'INRA. ....	67
Tableau 16: Observations des tailles de portée chez des brebis Noire du Velay porteuses ou non de la mutation $FecL^L$ . ....	68
Tableau 17: Répartition du SNP OARX:50977717T>A entre les groupes "cas" et les "contrôle" ....	72
Tableau 18: Résultats du génotypage $FecX^N$ pour les races françaises à partir du panel de diversité. ....	73
Tableau 19: Fréquence et effet de $FecX^N$ sur la moyenne brute de prolificité en NV et en BMC. ....	85
Tableau 20: Première estimation de la fréquence et effet brute de la mutation $FecX^N$ en Belle-Île. ....	85
Tableau 21: Effectif et effet brute de la mutation $FecX^N$ sur la totalité de la population Belle-Île. ....	85
Tableau 22: Tableau de contingence de la mutation $FecX^N$ chez les brebis Lacaune sélectionnées pour le GWAS. ....	86

Tableau 23: Tableau de contingence pour la mutation FecX <sup>Gr</sup> en Rasa Aragonesa. ....	87
Tableau 24: Fréquences des mutations FecX <sup>Gr</sup> et FecX <sup>R</sup> dans 4 élevages Rasa Aragonesa. ....	87
Tableau 25: GMQ 0-30 et 30-70 en fonction du génotype et du mode de naissance des agnelles Lacaune. ....	114
Tableau 26: Dosage de P4 pour chaque agnelle Lacaune. ....	116
Tableau 27: Résultats de la mise à la reproduction naturelle des agnelles Lacaune +/+ et L/+. ....	118
Tableau 28 : Concentration de LH pendant la phase folliculaire, moment et intensité du pic lors d'un cycle œstrien synchronisé sans PMSG chez des brebis Lacaune +/+ et L/+.....	121
Tableau 29 : Effet dose de PMSG sur la prolificité en installation expérimentale chez des brebis Lacaune +/+ et L/+. ....	124
Tableau 30: Effet de la dose de PMSG sur la fertilité et la prolificité à l'insémination animale (IA) dans l'élevage A pour des brebis Lacaune +/+ et L/+. ....	124
Tableau 31: Effet du génotype au locus FecL à la dose de PMSG 250 UI sur la fertilité et la prolificité à l'insémination animale (IA) de brebis Lacaune dans l'élevage B. ....	125
Tableau 32: Liste des amorces PCR utilisées pour génotyper les mutations FecX <sup>Gr</sup> , FecX <sup>L</sup> et FecL <sup>L</sup> . ....	157
Tableau 33: Amorces utilisées pour les séquençages des deux exons des gènes GDF9 et BMP15. ....	158
Tableau 34: Amorces et enzymes utilisées pour le génotypage par PCR-RFLP des mutations FecX <sup>N</sup> , FecX <sup>f</sup> et FecX <sup>C</sup> . ....	159
Tableau 35: Position génomique des mutations de BMP15 et GDF9 sur la version du génome OAR_v4.0.....	162
Tableau 36: Heure des différents prélèvements sanguins et endoscopie.....	168

# Liste des Procédures Expérimentales

PE 1: Génotypage PCR-KASPar .....	157
PE 2. Séquençage Sanger .....	158
PE 3. Génotypage PCR-RFLP .....	159
PE 4. Analyse d'association (GWAS) .....	160
PE 5. Séquençage tout génome (Illumina HiSeq) et alignement des séquences.....	161
PE 6. Analyse de la protéine par Western-Blotting.....	163
PE 7. Essai luciférase .....	164
PE 8. Electrophoretic Mobility Shift Assay .....	165
PE 9. Collecte d'ovocytes .....	166
PE 10 : Protocole « Puberté » - De la naissance à la 1 <sup>ère</sup> mise bas.....	167
PE 11 : Protocole « PMSG » - .....	168
PE 12. Pesé et Note d'État Corporel .....	169
PE 13. Protocole de d'Insémination Animale (IA) .....	169
PE 14. Réponse ovarienne – Endoscopie et échographie.....	170
PE 15. Dosage des hormones par ELISA.....	171



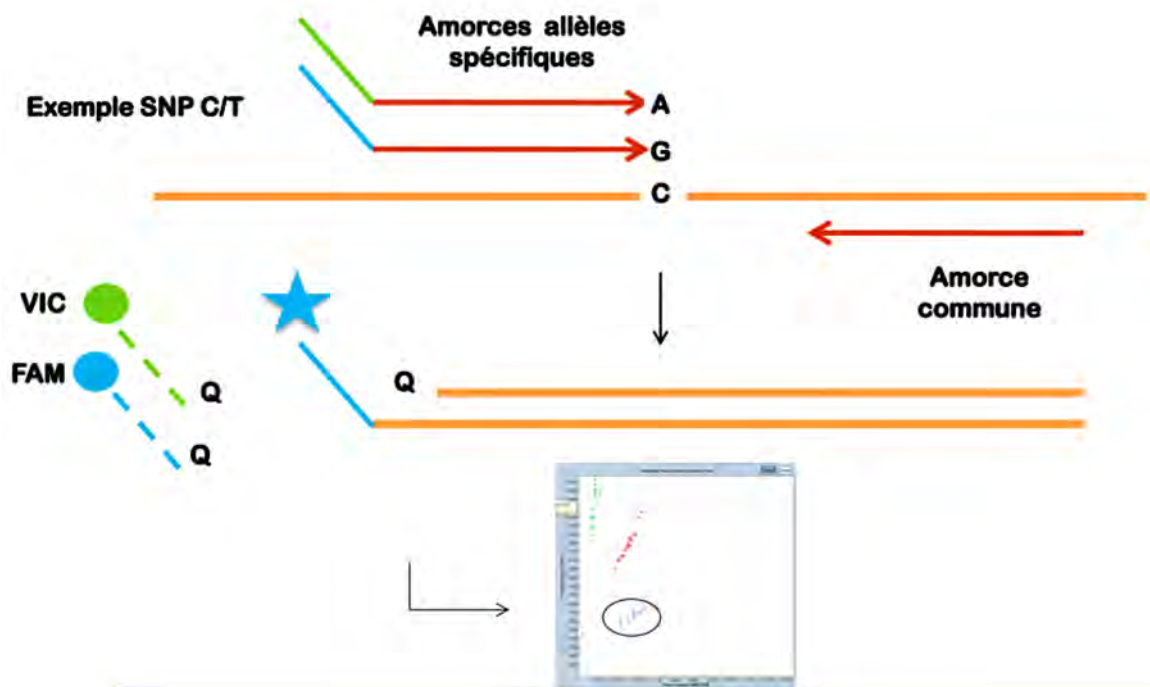


Figure 96: Principe du génotypage KASPar allèle spécifique

À chaque version du polymorphisme est attribué une amorce spécifique avec une queue fluorescente FAM ou VIC, ici bleu ou vert.

FAM :  $\lambda_{\max} / \text{nm}$  (absorption) = 494 ;  $\lambda_{\max} / \text{nm}$  (émission) = 518 ; E at  $\lambda_{\max}$  = 68000

VIC :  $\lambda_{\max} / \text{nm}$  (absorption) = 538 ;  $\lambda_{\max} / \text{nm}$  (émission) = 554

La fluorescence est quantifiée par ordinateur créant des nuages de point et le génotypage des individus.

E : coefficient d'extinction

Tableau 32: Liste des amorces PCR utilisées pour génotyper les mutations  $FecX^{Gr}$ ,  $FecX^L$  et  $FecL^L$ .

Locus/Chromosome	Primer sequence (variant allele underlined)	Position <sup>1</sup> (start, bp)	Application
BMP15	GGCACTTCATCATTGGACT	50,971,433	KAPA PCR $FecX^{Gr} / FecX^L$
OARX	GGCAATCATACCCCTCATACTCC	50,970,959	
	TCTGATCCACCAGCTCACTG	50,971,066	KASP PCR $FecX^{Gr}$
	CATTGCTCCCCATCTCTATAC	50,971,170	
	CATTGCTCCCCATCTCTATAC	50,971,170	
	GATGGGCTGAAAGTAAOCA	50971248	KASP PCR $FecX^L$
	ACCCGAGGACATACTCCCTTAC	50971137	
	ACCCGAGGACATACTCCCTTAC	50971137	
B4GALNT2/ OAR11	TGGTTCAAACCTCCTACATGCAAGA	36938189	KAPA PCR $FecL^L$
	TATGCATGGCATGTGATAGG	36938314	
	TATGCATGGCATGTGATAGG	36938314	KASP PCR $FecL^L$
	GCAAGAAGCTGCGTGTGT	36938207	
	GCAAGAAGCTGCGTGTGA	36938207	

<sup>1</sup> Position de départ des amorces (en paire de base) aligné sur la version OARv3.1 du génome ovin  
Table 1 ; Chantepie et al. 2018

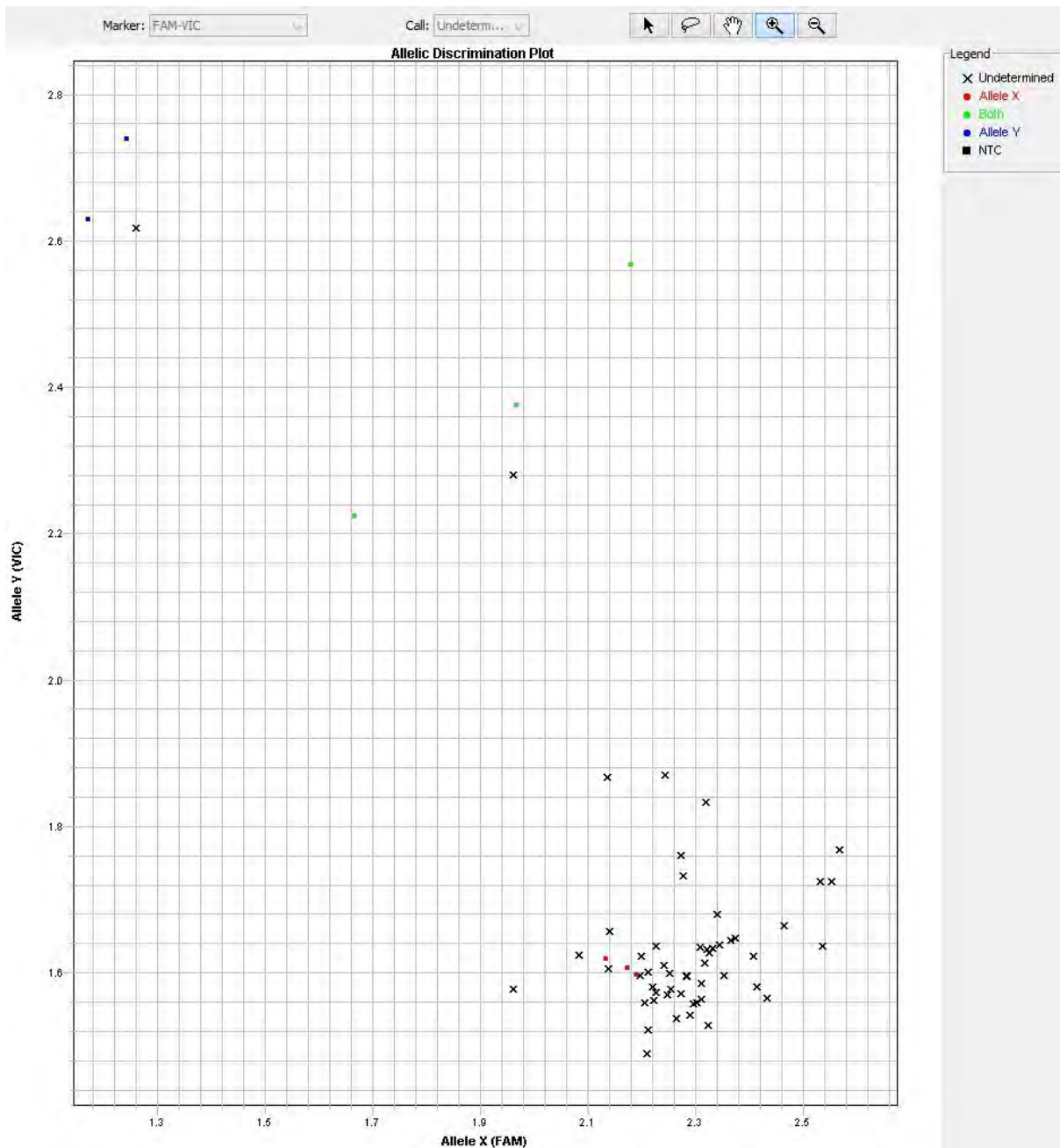


Figure 97: Résultats de génotypage de la mutation  $FecX^{Gr}$  par PCR-KASPar

Les croix noires représentent les échantillons testés. Les points sont les témoins, en rouge les +/+, en vert les hétérozygote Gr/+ et les mutants Gr/Gr en bleues. Les nuages de points autour des témoins forment le groupe du même génotype que les témoins.

## PE 1: Génotypage PCR-KASPar

La technique du KASPar (Kompetitive Allele Specific PCR) est une technique de génotypage par amplification PCR spécifique d'allèle en détection de fluorescence (KASPar ; Cuppen et al., 2007), Figure 96. Ce type de réaction nécessite 3 amorces différentes, deux amorces spécifiques à chaque allèle du polymorphisme et une amorce commune qui délimite le fragment à amplifier. Les amorces spécifiques ont une « queue » fluorescente (couplage d'un fluorophore de couleur différente pour chaque allèle). Il s'agit de la technique utilisée pour les mutations *FecX<sup>L</sup>*, *FecX<sup>Gr</sup>* et *FecL<sup>L</sup>*. Lorsque l'ADN à amplifier est homozygote, une seule couleur est amplifiée, lorsqu'il est hétérozygote, les deux couleurs sont amplifiées de façon équivalente. La fluorescence est quantifiée par un détecteur laser dans un thermocycleur de PCR en Temps Réel. L'ensemble des amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 32. Pour un échantillon d'ADN à une concentration de 10ng/μl, on a besoin de 1,25μl auquel on ajoute 2,5μl KASP V4.0 2x Master mix (LGC), 0,07μl du mix amorces et 1,43μl d'eau pour un volume réactionnel final de 5μl / échantillon.

L'amplification est réalisée grâce à un thermocycleur ABI 7900HT (Applied Biosystems) selon les conditions suivantes : 94°C durant 15 min, puis 10 cycles [94°C 20 sec, 62°C 60 sec, puis 36 cycles [94°C 20 sec, 54°C 20 sec] et enfin 15°C pendant 20 sec. Après l'amplification, la lecture en point final de la fluorescence est réalisée sur l'ABI 7900. La lecture et l'analyse des nuages points obtenues sont réalisées sous le logiciel SDS 2.4 (Applied Biosystems) (Figure 97).

Tableau 33 : Amorces utilisées pour les séquençages des deux exons des gènes GDF9 et BMP15.

<b>GDF9 exon 1</b>	GAAGACTGGTATGGGGAAATG	CCAATCTGCTCCTACACACCT
<b>GDF9 exon 2</b>	TGGCATTACTGTTGGATTGTTTT	GTCCTCCTTACACAACACACAG
<b>BMP15 exon 1</b>	TGGAAGTAGGGTGGGAACAG	ACTTTTCTTCCCCATTTTCTCCC
<b>BMP15 exon 2</b>	CGCTTTGCTCTTGTTCCCTC	GGCAATCATACCCTCATACTCC



## PE 2. Séquençage Sanger

Le séquençage permet de connaître l'enchaînement exact des nucléotides de l'ADN pour tout ou partie du génome. Pour ce faire, on commence par une PCR classique qui va permettre de sélectionner la ou les régions à séquencer. Les amorces pour le séquençage des gènes *BMP15* et *GDF9* ont été conçues sur la base du génome ovin Oar\_v3.1 du chromosome ovin 5 (NC\_019462) et du chromosome X (NC\_019484) et sont listées dans le Tableau 33. La vérification de la taille des fragments obtenus est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose.

La première étape du séquençage consiste à purifier les produits de la PCR par une réaction EXO/TSAP. L'exonucléase 1 (EXO, 20U/μl, Ozyme) permet d'éliminer les fragments d'ADN simple brin, donc les amorces utilisées dans l'étape PCR précédente. La Phosphatase Alkaline thermo-sensible (TSAP, 1U/μl, Promega) enlève les 5'P des nucléotides libres, ce qui empêche leur utilisation lors de la réaction de séquençage. La digestion se fait en présence de 2 à 8μl de produit de PCR avec 0,5μl EXO et 0,5μl TSAP dans 15μl (qsp 20μl) à 37°C pendant 45 min suivi d'une inactivation des enzymes à 80°C pendant 30 minutes.

La réaction de séquençage à proprement parlé est réalisée à partir des 15μl de l'étape de purification dans un volume de 20μl en ajoutant 2μl de tampon de réaction (5X), 1μl de BigDye Terminator Sequencing mix (AppliedBiosystems) et 1μl d'une amorce spécifique à 10μM. La réaction est une PCR modifiée selon le programme suivant ; une première étape de 5 minutes à 95°C puis d'une seconde étape répété 25 fois [96°C 5 min, 58°C 15 sec, 60°C 4 min]. Le BigDye Terminator Sequencing mix contient l'ADN polymérase et un mélange des 4 nucléotides (dNTPs) dont certains sont modifiés et fluorescents (une couleur par nucléotide, ddNTPs ou dye terminators). Ces ddNTPs bloquent la réaction de polymérisation de façon aléatoire à chaque nucléotide lorsqu'ils sont incorporés. Les fragments fluorescents générés sont séparés sur un gel d'acrylamide en micro-capillaires et la fluorescence lue par laser dans un séquenceur ABI 3730 (AppliedBiosystems). Cette lecture permet d'obtenir l'enchaînement de tous les nucléotides du fragment séquencé (entre 40 et 800 nucléotides).

Tableau 34 : Amorces et enzymes utilisées pour le géotypage par PCR-RFLP des mutations *FecX<sup>N</sup>*, *FecX<sup>If</sup>* et *FecX<sup>C</sup>*.

	Amorces	Enzyme	Taille des fragments (pn)
<b><i>FecX<sup>N</sup></i></b>	GAAGACTGGTATGGGGAAATG	MseI	+/+ = 189 + 152
	CACAAAGGATAGGGCAAGGA		N/+ = 280 + 189 + 152
			N/N = 280
<b><i>FecX<sup>If</sup></i></b>	CGCTTTGCTCTTGTCCCTC	Pvu2	+/+ =
	GGCAATCATACCCTCATACTCC		If/+
			If/If
<b><i>FecX<sup>C</sup></i></b>	CGCTTTGCTCTTGTCCCTC	HinfI	+/+ =
	GGCAATCATACCCTCATACTCC		C/+
			C/C
<b><i>FecG<sup>E</sup></i></b>	CTGAGTGAATACTTCGAACAG	XmnI	+/+ = 273 + 20
	AGCCATCAGGCTCGATGGCC		E/+ = 293 + 273 + 20
			E/E = 293

## PE 3. Génotypage PCR-RFLP

Le génotypage par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) est basé sur la digestion d'un fragment issu de PCR par une enzyme de restriction de l'ADN. Le génotypage est révélé par une migration électrophorétique sur gel d'agarose. L'amplification PCR permet de cibler l'endroit précis du génome qui contient le SNP d'intérêt. Le choix de l'enzyme de restriction se fait sur la capacité d'un ou l'autre allèle du SNP à faire apparaître ou disparaître son site de coupure sur l'ADN. Ainsi, en fonction de l'allèle présent, et après digestion par l'enzyme, le nombre et la taille de fragments révélés sur gel d'agarose seront différents. Il s'agit de la technique utilisée pour la mutation *FecB<sup>B</sup>* et que j'ai choisi de développer pour les mutations nouvellement identifiées (*FecX<sup>N</sup>*, *FecX<sup>C</sup>* et *FecX<sup>Jf</sup>*). Les amorces PCR utilisées pour réaliser le génotypage de ces mutations sont listées dans le Tableau 34, ainsi que les enzymes et les tailles de fragments obtenues par génotype.

Les amplifications PCR ont été réalisées sur un thermocycleur ABI200 (Applied Biosystems) dans les conditions suivantes : 5 min à 94 °C, 32 cycles de 30 secondes à la température de fusion spécifique, 30 secondes à 72 °C et 30 secondes à 94 °C, suivis de 5 min à 72 °C. Les amorces utilisées dans cette étude sont énumérées dans le Tableau 33. Par la suite, 10µl du produit PCR est digéré par l'enzyme spécifique à chaque mutation toute la nuit à 37°C. Finalement, le produit de la digestion est contrôlé par migration de 10µl de la réaction sur gel d'agarose 2%.



## PE 4. Analyse d'association (GWAS)

L'analyse d'association ou GWAS (Genome-Wide Association Study) est un outil particulièrement puissant qui a déjà permis de mettre en évidence plusieurs mutations comme les mutations *FecX<sup>O</sup>* et *FecX<sup>Gr</sup>*. Il repose sur le principe du déséquilibre de liaison qui consiste en la non-indépendance de SNPs donnés. Pour deux SNPs A et B qui possèdent respectivement les allèles (A1, A2) et (B1, B2), il existe quatre combinaisons de SNP (autrement dit quatre haplotypes) possibles : A1/B1, A2/B1, A1/B2 et A2/B2. Lorsque certains haplotypes sont plus fréquents alors il existe une association préférentielle entre les marqueurs, il y a alors un déséquilibre de liaison. Lors de l'apparition d'une mutation, celle-ci va être en déséquilibre de liaison avec tous les marqueurs autour d'elle. Dans l'analyse d'association, on teste l'association entre un marqueur et un phénotype dans une population supposée non apparentée. Comme les individus ne sont pas liés entre eux, il ne peut y avoir transmission de phase et de ce fait toute association entre un marqueur et le phénotype indique la proximité d'un gène ayant une influence sur le phénotype. Pour réaliser ce type d'analyse, des puces de génotypages sont utilisées pour génotyper les animaux sur un grand nombre de marqueurs.

Dans le cadre des travaux sur la race Noire du Velay, c'est la puce OVINE SNP50K BeadChip qui comprend 54 241 SNPs répartis sur l'ensemble du génome, qui a été utilisée. Les 80 brebis utilisées ont été classées en deux groupes, hautement prolifique (n= 40 ; moyenne TP = 2,47) et peu prolifique (n=10 ; moyenne TP = 1,23) afin de réaliser une analyse cas/control. Les données ont été nettoyées et analysées par le logiciel Plink, ce qui a permis de réduire le nombre de SNPs informatif à 47 446 pour 79 animaux. Les filtres utilisés sont les suivants: call rate <0,98; minor allele frequency (MAF) <0,01; call frequency <0,95 ; significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the controls ( $p < 1.10^{-6}$ ).



Pour la race Rasa Aragonesa, c'est la puce de génotypage Illumina AgResearch Sheep HD (680K) selon le protocole du fabricant du Laboratoire d'Analyses Génétiques de Espèces Animales (LABOGENA, Jouy en Josas, France; [www.labogena.fr](http://www.labogena.fr)), sur l'ensemble des 158 brebis. Les données de prolificité étant réparties de façon homogène, j'ai décidé d'utiliser les données sous forme quantitative et non sous la forme Cas vs Contrôle. À partir de l'ensemble des données, soit 606 006 marqueurs et l'ensemble des individus, différents filtres ont été effectués. Aucun individu n'a été exclu pour manque d'information de génotypage (call rate < 0,90). Pour les SNPs, j'ai utilisé les filtres suivants ; fréquence d'allèle mineur (MAF) <0,01 et taux d'appel manquant des marqueurs (geno) <0,01. Les positions SNP non polymorphes et les marqueurs sans position sur la carte du génome de référence OARv3.1 ont également été rejetés. Le jeu de données final a été réduit à 576 086 marqueurs analysés chez l'ensemble des 158 individus.

Tableau 35 : Position génomique des mutations de BMP15 et GDF9 sur la version du génome OAR\_v4.0.

Gène	Mutation	Position OAR_V4.0
BMP15	<i>FecX<sup>Bar</sup></i>	g.50,986,418
	<i>FecX<sup>R</sup></i>	g.50,980,951
	<i>FecX<sup>G</sup></i>	g.50,980,693
	<i>FecX<sup>t</sup></i>	g.50,980,540
	<i>FecX<sup>l</sup></i>	g.50,980,515
	<i>FecX<sup>Gr</sup></i>	g.50,980,461
	<i>FecX<sup>t</sup></i>	g.50,980,449
	<i>FecX<sup>O</sup></i>	g.50,980,402
	<i>FecX<sup>B</sup></i>	g.50,980,311
GDF9	<i>FecG<sup>V</sup></i>	g.41,768,536
	<i>FecG<sup>E</sup></i>	g.41,768,445
	<i>FecG<sup>NW</sup></i>	g.41,768,368
	<i>FecG<sup>H</sup></i>	g.41,768,295
	<i>FecI<sup>T</sup></i>	g.41,768,200



## PE 5. Séquençage tout génome (Illumina HiSeq) et alignement des séquences

Les séquences ont été réalisées à partir de 1µd d'ADN grâce à un HiSeq 2500 (Illumina) sur la plateforme Genotoul-Get (INRA Toulouse, <https://get.genotoul.fr>). Les lectures brutes du séquençage ont été prétraitées par éliminations des séquences de l'adaptateur. Les alignements de lecture et les recherches de variants ont été effectués à l'aide de l'instance locale de Galaxy (<https://galaxyproject.org>) sur la plateforme bio-informatique de Toulouse Midi-Pyrénées (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>). Les lectures appariées et nettoyées ont été combinées et cartographiées contre l'ensemble du génome ovin (Oar\_v3.1) en utilisant l'outil BWA-MEM (Galaxy version 0.7.17.1). Les fichiers BAM résultants ont été triés à l'aide de l'outil Samtools\_sort (Galaxy version 1.0.0). Le logiciel Integrative Genome Viewer, version 2.4.10 a permis la visualisation des séquences. Nous avons utilisé l'outil GATK version 3.5-0 afin de mettre en évidence simultanément les SNPs et InDels sur l'ensemble des échantillons en utilisant des paramètres de filtrage standard, conformément aux recommandations de GATK Best Practices (DePristo et al., 2011; Van der Auwera et al., 2013). L'effet des variants et l'annotation ont été réalisés par SNPEff version 4.1 et le filtrage des variants par l'outil SNPSift.

Les positions génomiques des mutations connues dans les gènes *BMP15* et *GDF9* sur la version Oar\_v4.0 sont données dans le Tableau 35.

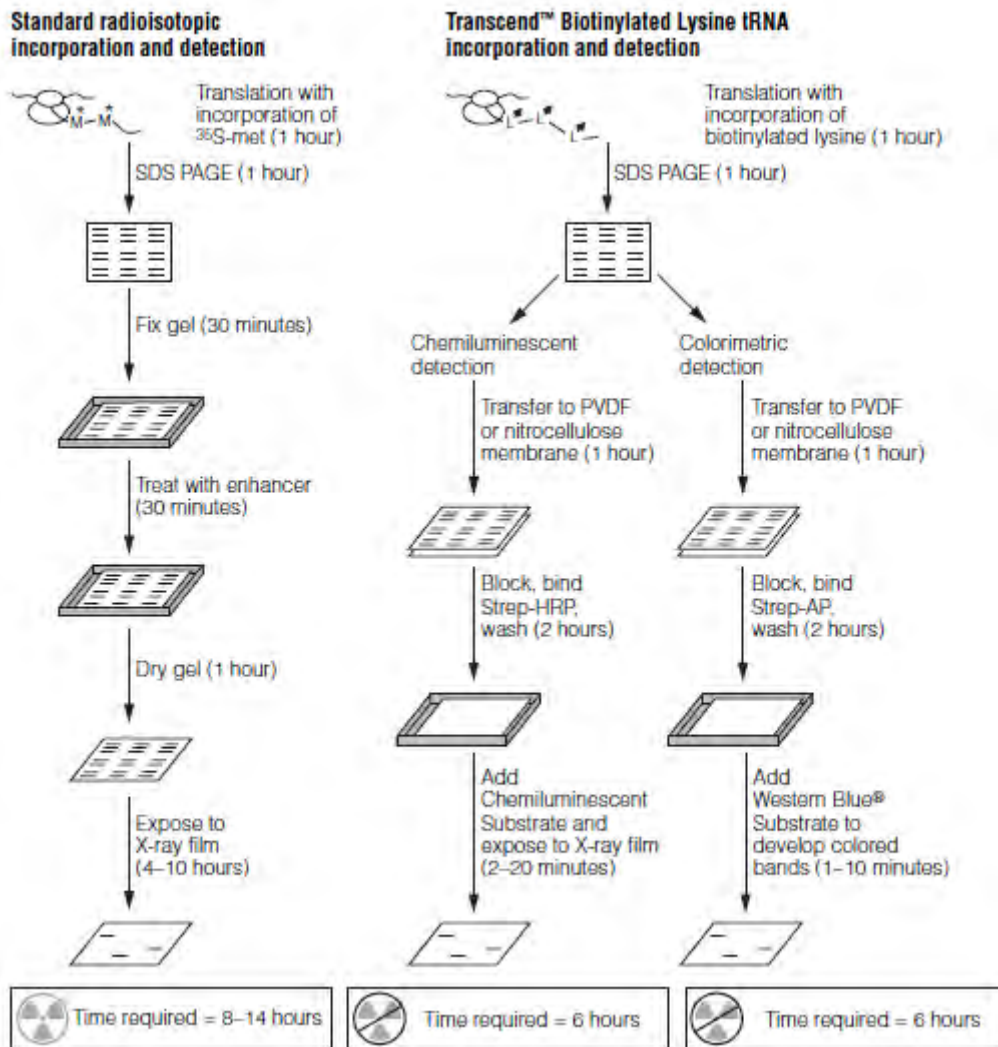


Figure 98: Comparaison des protocoles d'incorporation et de détection utilisant des acides aminés radiomarqués ou biotinylés.

## PE 6. Analyse de la protéine par Western-Blotting

La protéine BMP15 a été produite au laboratoire à partir de l'ADNc complet de *BMP15* mutant ou sauvage avec l'aide du kit TnT T7 Quick Coupled Transcription/Translation (Promega). La traduction a été réalisée en lysat de réticulocyte de lapin en présence d'acides aminés biotinilés et la protéine BMP15 produite séparée par électrophorèse sur un gel dénaturant d'acrylamide.

La protéine résultante a été révélée en utilisant une méthode de détection par chemiluminescence non radioactive par de la streptavidine couplée à une activité peroxydase. Le signal chemiluminescent a été capturé par le système d'image ChemiDoc MP et les images analysées par le logiciel Lab Software (Bio-Rad).

L'étude a été menée à partir de protéines BMP15 produites in vitro grâce au kit TnT Quick coupled transcription/translation Systems (Promega) à partir de l'ADNc de *BMP15* complet mutant ou sauvage à la mutation *FecX<sup>N</sup>*. Les échantillons ont été repris dans du tampon Laemli (Bio-Rad) en condition dénaturante ( $\beta$ -Mercaptoethanol, 95°C pendant 5 minutes) pour être ensuite soumis à une électrophorèse SDS-PAGE dans un gel de polyacrilamide à 10% et transférés sur des membranes de nitrocellulose.

Après 3 lavages en PBS-Tween 20 0,05% (Sigma, PBST), les membranes ont été saturées dans du PBS-Tween 20 avec 5%BSA pendant 1 heure à températures ambiante puis incubées avec 50 $\mu$ l de l'anti IgG de lapin couplés à une peroxydase pendant 15 minutes supplémentaires.

Après 4 lavages, les protéines précipitées ont été révélées par chemiluminescence (Figure 98) après une incubation de 2 minutes dans un mélange volume à volume de Luminol-enhancer avec la solution de peroxyde (Clarity, Bio-Rad). Enfin la luminescence a été capturée par un imageur ChemiDoc MP et analysée par le logiciel Image Lab Software (Bio-Rad).

Pour cela j'ai cloné l'ADNc complet de *BMP15* avec ou sans l'allèle *FecX<sup>N</sup>* dans un plasmide permettant la transcription via le promoteur T7.



## PE 7. Essai luciférase

Afin de voir si la mutation avait ou non une activité régulatrice, nous avons utilisé un gène rapporteur, la luciférase. La séquence promotrice du gène *BMP15* ovin a été amplifiée par PCR à partir de brebis homozygote *FecX<sup>+</sup>* et *FecX<sup>N</sup>*. Deux tailles de fragments ont été générées pour le clonage du promoteur BMP15 devant le gène rapporteur de la luciférase (Luc), une forme longue (lg) de 732 pb ([-743, -11] pb faisant référence au codon de départ ATG) et une forme courte (sh) de 341 pb ([-443, -102] pb). Les produits de PCR ont été mis au point pour la digestion à l'aide des enzymes de restriction Kpn1 et Hind3 (New England Biolabs) et insérés dans le vecteur pGL4.23 (Promega). Les quatre constructions résultantes (lgBMP15 + -Luc; lgBMP15N-Luc; shBMP15 + -Luc; shBMP15N-Luc) ont été contrôlées par séquençage de Sanger.

Vingt-quatre heures après l'ensemencement (3.10<sup>4</sup> cellules / puits, plaque de 24 puits), les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) ont été transfectées en utilisant de la Lipofectamine 3000 (Invitrogen) avec 500 ng / puits de constructions pGL4.23, vides ou contenant le fragment promoteur BMP15. Quarante huit heures après la transfection, les cellules ont été lysées et leur activité luciférase a été analysée (kit de dosage de la luciférase, Promega). La luminescence en unités de lumière relative (RLU) a été mesurée par un lecteur de microplaques Glomax (Promega). Chaque construction a été testée en triple dans 6 expériences de transfection indépendantes.

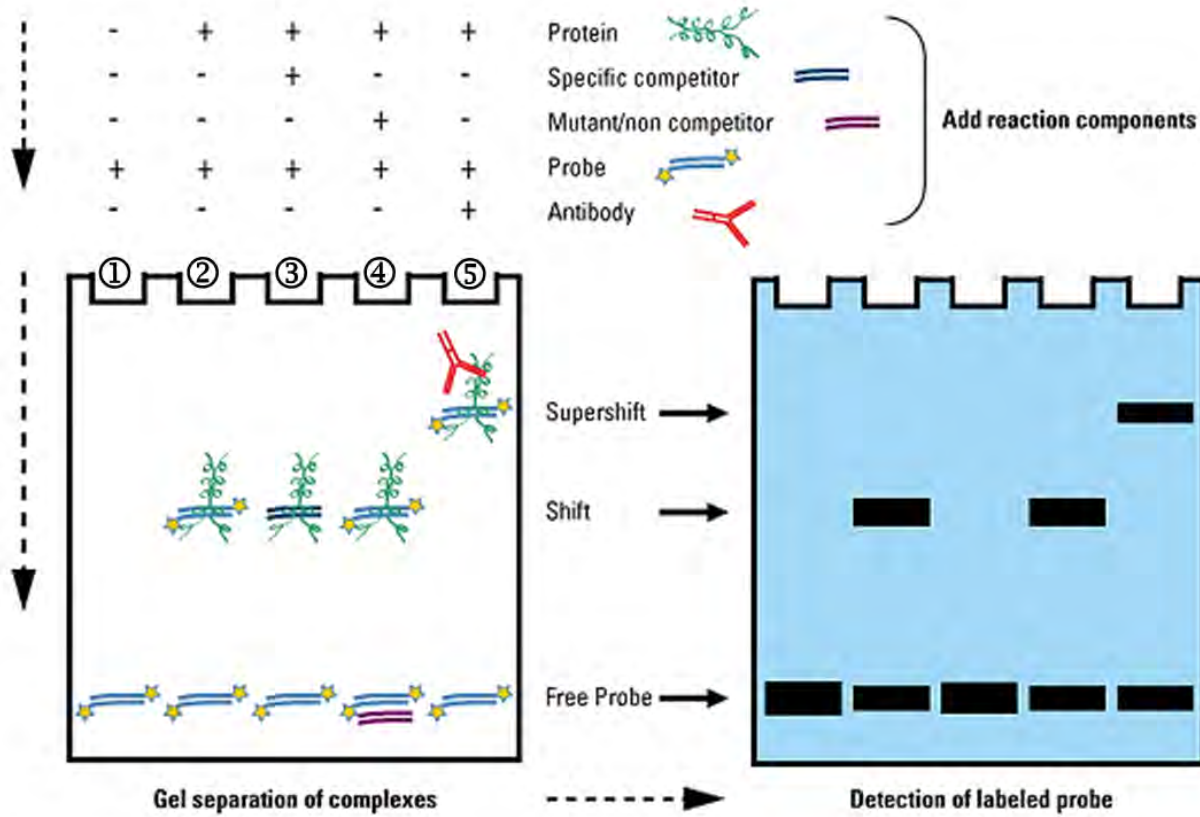


Figure 99: Principe du retard sur gel.

(D'après la fiche technique ThermoScientific, <http://www.piercenet.com>). La technique de gel retard est constituée de trois grandes étapes : (1) les réactions de liaison protéine-ADN, pour laquelle l'ordre de l'ajout des différents composants est très souvent critique, (2) l'électrophorèse, qu'il est préconisé de réaliser aussitôt les complexes, labiles, créés afin d'optimiser leur visualisation lors de l'étape (3) la détection de la sonde. Sur ce schéma il est possible de voir 1) la migration d'un fragment d'ADN "libre", 2) le retard de migration de ce même fragment lorsqu'il est lié à une protéine, 3) l'élimination complète de ce shift lorsqu'un compétiteur spécifique est ajouté, il s'agit donc là d'un contrôle de spécificité de liaison, 4) le contrôle négatif avec l'ajout d'un compétiteur non spécifique et 5) un super-shift lors de l'ajout d'un anticorps dirigé contre la protéine du complexe. Enfin, lors de la présence de la protéine du complexe, du compétiteur spécifique et de l'anticorps spécifique, il est possible d'observer, non pas la disparition complète des bandes d'ADN « libre », mais une diminution de leur intensité.

## PE 8. Electrophoretic Mobility Shift Assay

La technique EMSA repose sur l'aptitude des fragments d'ADN purifiés à migrer à travers un gel polyacrilamide non-dénaturant à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire (Figure 99). Ainsi, si des protéines sont capables d'interagir avec ces fragments d'ADN et ainsi former un complexe, elles peuvent en altérer la vitesse de migration au cours de l'électrophorèse. Grâce à l'utilisation de sondes (séquences d'ADN d'intérêt) marquées (marquage chaud ou froid), il est possible d'observer facilement le retard de migration et donc de juger très rapidement si une séquence d'intérêt a été reconnue et liée par une protéine.

La première étape consiste à « designer » les fragments d'ADN contenant le polymorphisme d'intérêt. Ces fragments d'ADN sont des oligonucléotides qui ont été construits sur la base de la séquence du locus. Ainsi, autour de chacun des SNPs, deux couples d'oligonucléotides sens et anti-sens biotynilées en 5' de soixante nucléotides chacun ont été créés (Sigma). Les couples d'oligonucléotides complémentaires sont mélangés de façon équimolaire (1pmol/ $\mu$ l) dans un milieu 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl (pH 8.0) et hybridés pour former une sonde double-brin selon un cycle de dénaturation à 95°C (5 minutes) et d'hybridation par diminution progressive de la température jusqu'à 4°C (1°C/min) dans un thermocycler PE9700 (Perkin Elmer). En parallèle, des protéines nucléaires et cytoplasmiques ont été extraites à partir de 1.106 cellules de granulosa isolées de follicules ovariens +/+ et L/L en utilisant le kit NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific Pierce). L'étape suivante consiste en la liaison des protéines nucléaires ou cytoplasmiques avec les quatre sondes biotynylées (20fmol) en respectant les conditions de liaison préconisées de base dans le kit LightShift® Chemiluminescent EMSA (Thermo Scientific Pierce) en présence de 1 $\mu$ g de compétiteur polydI/dC. Les complexes sont séparés sur mini-gel de polyacrilamide 5% (Bio-Rad), puis transférés sur membranes de nylon Hybond N+ (GE Healthcare Lifescience) et immédiatement fixés par une exposition aux ultra-violets (120mJ/cm<sup>2</sup>) pendant une minute (Stratalinker, Stratagene). Les complexes sont révélés par chemiluminescence suite à l'incubation avec la streptavidine couplée à une HRP (horseradish peroxidase) et l'acquisition a ensuite été réalisée par une caméra Chemidoc avec une analyse d'image grâce au logiciel ImagLab (BIO-RAD).





## PE 9. Collecte d'ovocytes

Pour la collecte des ovaires et l'isolement des ovocytes, les cycles œstrus de toutes les brebis adultes NV et BMC ont été synchronisés avec des éponges intravaginales imprégnées d'acétate de flugestone (FGA, 30 mg, CEVA) pendant 14 jours. Les ovaires ont été prélevés lors de l'abattage au cours de la phase folliculaire, 36 heures après le retrait de l'éponge par FGA. Les complexes Cumulus-ovocytes (COC) ont été immédiatement récupérés de tous les follicules visibles de 1-3 mm par aspiration en utilisant une seringue de 1 ml avec une aiguille 26G et placés dans un milieu de culture de McCoy 5A (Sigma-Aldrich). Les COC ont été dissociés mécaniquement par plusieurs cycles de pipetage et de lavage dans des gouttes de 150 µl de milieu 5A de McCoy et, enfin, des ovocytes dénudés dépourvus de cellules de la granulosa ont été récupérés dans du PBS 1X. Seuls les ovocytes intacts présentant une bonne homogénéité du cytoplasme ont été regroupés pour obtenir deux à trois pools de 5 ovocytes par animal et conservés à -80 ° C avant l'extraction de l'ARN.

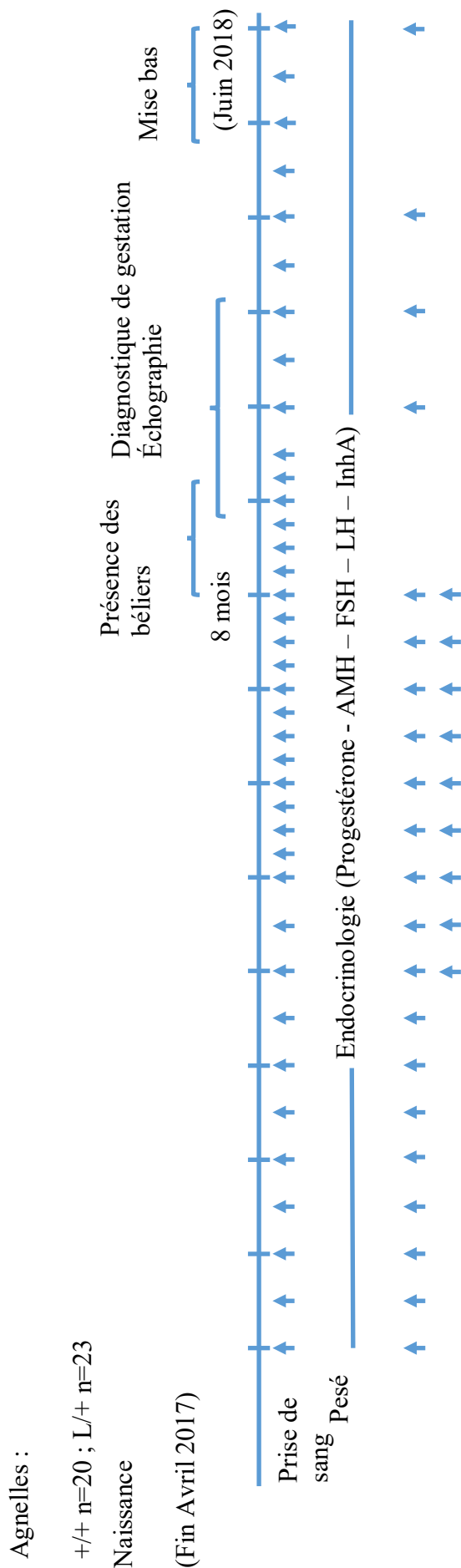


Figure 100: Frise chronologique du protocole expérimental de prise de sang, pesée et NEC de la naissance à la puberté.

## PE 10 : Protocole « Puberté » - De la naissance à la 1<sup>ère</sup> mise bas

80 brebis Lacaune issues du rameau viande (mère *FecL<sup>+</sup>/FecL<sup>+</sup>* (+/+) n= 66 ; mère *FecL<sup>L</sup>/FecL<sup>+</sup>* (L/+) n=14) ont été achetées dans deux élevages commerciaux dans le but de générer des agnelles de génotypes +/+ et L/+. L'ensemble des animaux a été élevé au sein de l'installation expérimentale du domaine de Langlade (INRA, Toulouse). La semence de 8 béliers Lacaune viande a été utilisée (+/+ n= 2 ; L/+ n=6) pour l'insémination artificielle. Un bélier L/L a été utilisé pour les retours en chaleurs des mères pour lesquelles l'IA n'avait pas fonctionné. Finalement, 53 agnelles sont nées de ces accouplements et j'ai sélectionné, sur la base du génotype, de la date de naissance et du pedigree, 43 agnelles (+/+ n=20 ; L/+ n= 23) afin de réaliser le suivi de la croissance et endocrinien de leur naissance à leur première mise bas.

L'âge à la puberté est un paramètre important à connaître pour déterminer le début de la carrière reproductive et donc productive d'une brebis. Ce premier protocole s'intéresse aux effets de l'allèle prolifique L sur la puberté des agnelles de race Lacaune. Les agnelles sont nées en avril 2017 et ont eu un suivi endocrinien, de poids et d'état corporel depuis leur naissance jusqu'à leur première mise à la reproduction en juin 2018.

Les prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les deux semaines à partir du jour de la naissance jusqu'à l'âge de 5 mois. Ensuite, les prélèvements ont été réalisés toutes les semaines (Figure 100). Les hormones qui m'ont intéressé sont: la progestérone (P4), indicatrice d'un évènement d'ovulation ainsi que l'Hormone Anti-Müllérienne (AMH) et l'Hormone Folliculo-Stimulante (FSH), des hormones marqueurs de la croissance et de la réserve folliculaire. Je me suis également intéressée à l'Inhibine A car il a été établi que cette hormone était l'une des cibles de B4GALNT2 (Drouilhet et al., 2013).

Une partie de ces mêmes brebis, 60 mères et filles confondues, ont ensuite participé à un second protocole permettant ainsi de d'appliquer le troisième « R », Réutilisé de la règle des 3R en expérimentation animal (Réduire, Raffiner, Remplace). Ce protocole visait à observer l'effet de différentes doses de PMSG et est décrit ci-dessous (Protocole « PMSG »).

Tableau 36: Heure des différents prélèvements sanguins et endoscopie.

Jour 1		Jour 2			Jour 3				Jour 4			Jour 5		Jour 6		Jour 7		Jour 8		
12:00	18:00	0:00	6:00	12:00	18:00	0:00	4:00	8:00	12:00	16:00	20:00	0:00	4:00	8:00	12:00	12:00			8:00	12:00
H0	H6	H12	H18	H24	H30	H36	H40	H44	H48	H52	H56	H60	H64	H68	H72	H84	H96	H108		

Endoscopie

## PE 11 : Protocole « PMSG » -

### Au cours du cycle œstral

La réponse au traitement de synchronisation par éponge de fluogésérone et PMSG a été évaluée d'un point de vue hormonal et ovarien. Ce protocole à deux objectifs, premièrement, déterminer l'effet de la mutation *FecL<sup>L</sup>* sur la réponse à la PMSG et deuxièmement, savoir si la mutation *FecL<sup>L</sup>* peut permettre de diminuer la dose d'hormone utilisée. Pour cela, j'ai testé deux doses de PMSG, 250 UI (demi-dose) et 450 UI (dose classiquement utilisée en élevage Lacaune allaitant). Afin d'établir les profils endocriniens (LH, de FSH, de progestérone, d'AMH et d'Inhibine A) nous avons réalisé des prises de sang à intervalle régulier. D'abord toutes les 6h durant les 36 premiers heures, ensuite, toutes les 4h durant les 36h suivantes et enfin 1 fois par jour sur les 4 jours suivants (Tableau 36: Heure des différents prélèvements sanguins et endoscopie). Une endoscopie a été réalisée 7 jours après l'injection de PMSG afin de dénombrer le nombre de corps jaune (PE 14).

### En élevage

Afin de valider les résultats expérimentaux du protocole « PMSG » j'ai réitéré ce protocole au sein d'un élevage commercial. Ainsi, quatre conditions (deux doses 250 UI et 400 UI pour les brebis +/+ et 0 UI et 250 UI pour les brebis L/+) sur 234 brebis (150 brebis +/+ et 84 brebis L/+) ont été testées avec un contrôle de gestation par échographie trans-abdominale. Le protocole d'insémination suivi est celui d'écrit dans le PE 14. Après les mises bas, les données de fertilité et de prolificité ont été analysées en fonction du génotype au locus *FecL*.

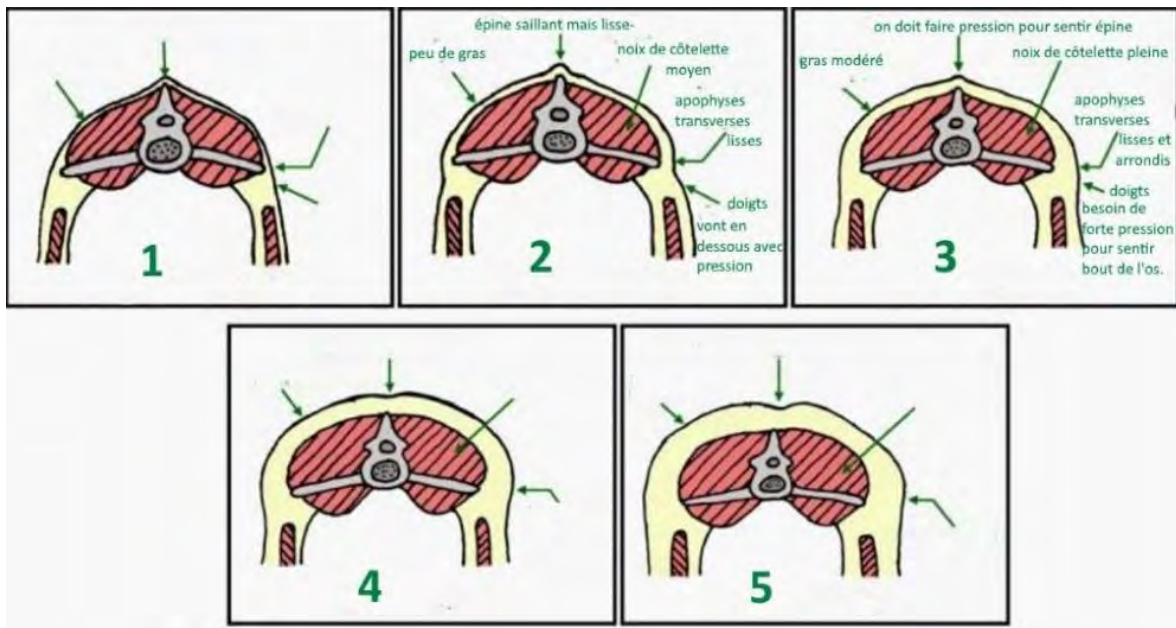


Figure 101 : Coupe transversale au niveau des lombaires schématisant les différentes notes de NEC chez l'ovin.

(D'après Thomson & Meyer, 1994)

## PE 12. Pesé et Note d'État Corporel

Le poids a été mesuré de façon systématique chez les 43 agnelles au même moment que les prélèvements sanguins du protocole « Puberté ». Nous avons utilisés à une balance électronique, sensible à 100 grammes. La note d'état corporel a été évaluée à partir de l'âge de 6 mois par les techniciens animaliers formés à cette pratique. La notation est comprise entre 0 et 5 (écart de notation : 0,25), respectivement de très maigre à suiffarde, et est établie après palpation des lombaires (Figure 101 ; (Russel et al., 1969; Thompson and Meyer, 1994).

## PE 13. Protocole de d'Insémination Animale (IA)

Les éponges vaginales destinées à la synchronisation des chaleurs ont été mises au point en Australie dans les années 1960. Le dérivé de progestérone dont elles sont imbibées bloque l'activité ovarienne, supprimant ainsi les chaleurs. La levée de cette inhibition entraîne le redémarrage du cycle et donc l'induction des chaleurs. La gonadotrophine (PMSG) injectée au moment du retrait de l'éponge renforce l'ovulation. Chez les brebis et les agnelles, l'éponge vaginale est imprégnée d'un progestagène de synthèse, l'acétate de flugestone. Elles sont mises en places pour une durée de 14 jours. Le jour du retrait, une injection par voie intramusculaire de PMSG est pratiquée. En élevage Lacaune viande, la dose couramment utilisée est de 450 UI par brebis. Dans le cadre de l'expérimentation, pour des raisons pratiques, la demi-dose de PMSG est de 250 UI. Par lot de 20 brebis Lacaune adultes de génotypes +/+ et L+ (par lot :  $n \approx 10$  L/+ ;  $n \approx 10$  +/+), nous avons testé ces deux doses ainsi qu'un groupe contrôle qui a reçu une injection de sérum physiologique. Les brebis ont reçu des doses différentes au cours des trois cycles étudiés non successifs.

Les premières chaleurs apparaissent dans un délai de 24 heures et l'insémination est pratiquée à heure fixe, 55 heures après le retrait de l'éponge chez les brebis. Il est conseillé d'avancer l'insémination à 50 heures post retrait chez les agnelles. Une insémination artificielle a été réalisée à partir de semence fraîche à la suite du troisième protocole de synchronisation.





## PE 14. Réponse ovarienne – Endoscopie et échographie

À la suite des deux premiers protocoles de synchronisation nous avons dénombré les corps jaunes résultants des ovulations par endoscopie 8 jours après l'injection de PMSG. Pour la réalisation de cet acte invasif, les brebis ont été tranquilisées par injection intramusculaire de Rompun 2%® en Intramusculaire à 0.25 ml/100kg, 30 minutes avant l'observation. Une anesthésie locale est réalisée (LUROCAINE ND) par injection sous cutanée multipoints de 1ml autour des sites d'incision (à distance de 3 cm).

Après l'insémination animale, lors du troisième protocole de synchronisation, nous n'avons pas réalisé d'endoscopie afin de ne pas engendrer de perte embryonnaire. La fertilité a été évaluée par échographie trans-abdominale environ deux mois après l'insémination.



## PE 15. Dosage des hormones par ELISA

Les prises de sang ont été effectuées à la veine jugulaire grâce à l'utilisation du système Venoject et des tubes héparinés.

Tous les dosages hormonaux ont été réalisés à partir du plasma des brebis Lacaune +/+ et L/+ prélevés au cours des deux protocoles décrits précédemment. Immédiatement après les prélèvements sanguins, les sangs héparinés ont été centrifugés à 4000 rpm pour une durée de 15 minutes. Puis le plasma a été aliquoté, environ 1ml dans des tubes secs et placé à -20°C jusqu'à la réalisation des différents dosages hormonaux.

Préalablement aux dosages, les échantillons ont été décongelés dans un bain d'eau tiède, agités puis centrifugés (2000 g, 4°C, 20 minutes) afin de retirer les fragments de cellules qui pourraient interférer avec les réactifs du dosage. Les gammes ont été réalisées dans du sérum ovin castré. La phase d'incubation avec les anticorps spécifiques de chaque hormone a été allongée à durée d'environ une nuit à 4°C en plus du temps prévu dans chaque kit.

L'ensemble des dosages de l'Inhibine A a été effectué en suivant les recommandations du kit Inhibin A ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay ; Beckman Coulter), qui permet la mesure de l'Inhibine A uniquement sous sa forme dimérique à partir de 50µl de plasma non dilué.

Les dosages d'AMH ont été effectués en suivant le protocole du kit AMH Gen II (Beckman Coulter) à partir de 50µl de plasma non dilué. Afin d'augmenter la sensibilité du dosage, 5µl d'EDTA (18ng/ml) ont été ajoutés à chaque puits avant les échantillons.

Les dosages de progestérone (P4) suivant les recommandations du kit Plasma/Serum Progesterone Enzyme immunoassay (Ridgeway Science) à partir de 10µl de plasma non dilué.

L'ensemble des dosages de FSH et de LH ont été effectués au laboratoire de la Phénotypage-Endocrinologie (INRA Val de Loire) à partir de 20µl de plasma non dilué comme décrit précédemment par Faure et al. (Faure et al., 2005). La limite de détection des dosages de FSH est estimée à 0,2ng/ml et à 0,1 ng/ml pour la LH.

Les données sont représentées par les moyennes  $\pm$  SEM. Le profil endocrinien moyen des animaux +/+ et L/+ a été calé sur le moment du pic de LH. Le temps par rapport au pic de LH est donné en écart d'heures relatives à la survenue du pic de LH.

# Involvement of the *FecX<sup>Gr</sup>* mutation in the high prolificacy of the Flemish sheep breed in Belgium

R. Meyermans<sup>1</sup>, L. Chantepie<sup>2</sup>, S. Fabre<sup>2</sup>, F. Woloszyn<sup>2</sup>, J. Sarry<sup>2</sup>, N. Buys<sup>1</sup>, L. Bodin<sup>2</sup> and S. Janssens<sup>1</sup>

<sup>1</sup>KU Leuven, Livestock Genetics, Department of Biosystems, 3001 Heverlee, Belgium

<sup>2</sup>INRA, GenPhySE, Dastanet Tolosan, France

## Introduction

The Flemish sheep breed is of the dairy type and currently considered a rare breed in Flanders (Belgium). The original breeding objective of the Flemish sheep was wool production (18th century) but it was also known for its high litter size and good maternal capacity. Litter sizes with 3 to 5 lambs are no exception.



## Objectives

- To analyze pedigree data in order to support conservation efforts.
- To investigate the high prolificacy in the breed by screening for known mutations

## Conclusion

- A relative high heritability is found for prolificacy.
- The segregation of the *FecX<sup>Gr</sup>* mutation is evidenced in the Flemish sheep breed.

This discovery underlines the importance of conservation and investigation of endangered breeds. They may harbour valuable alleles for the future!

## Material & Methods

- Pedigree data ( $n = 5095$ ) and litter size information (2385 litters from 1224 ewes) were used in quantitative analysis.
- 58 animals (20 rams and 38 ewes) were screened for all known mutations in the ovine *Fec*-gene loci.

## Results

### Diversity of the breed:

- The average inbreeding coefficient was estimated at 0.055.
- The effective population size was estimated at 124 (based on increase in coancestry) and 55 (based on increase of inbreeding).

### Litter size:

- Using a linear model, a relatively high heritability of 0.25 was estimated for the number of total lambs born.

### Screening analysis:

- Four individuals (1 ram and 3 ewes; 8.6%) were identified as carriers of the *FecX<sup>Gr</sup>* mutation in the *BMP15* gene, originally evidenced in the French Grivette breed (Demars et al., Plos Genet. 2013).
- No other already known mutations were detected.

# Annexe 1: Involvement of the *FecX<sup>Gr</sup>* mutation in the high prolificacy of the Flemish sheep breed in Belgium



**Mise en évidence et analyse fonctionnelle des mutations affectant la prolificité des ovins allaitants**

Directeur de thèse : Stéphane Fabre

Soutenue le 19 Décembre 2019 à l'INRA Occitanie-Toulouse (31326 Castanet Tolosan)

## Résumé grand public

Chez les ovins allaitants, la prolificité (nombre d'agneaux par mise-bas) est un levier technico-économique important pour améliorer la rentabilité d'un élevage. D'un point de vue génétique, des mutations ayant un effet important sur l'augmentation de la prolificité existent dans certaines races ovines. L'objectif de cette thèse est l'identification de ces mutations de prolificité dans les races ovines allaitantes pour lesquelles est posée une hypothèse statistique de présence de telles mutations. En associant des approches de génétique, de génomique à haut-débit, et de biologie moléculaire et fonctionnelle, j'ai identifié 5 mutations (2 nouvelles, 3 connues) à effet majeur sur la prolificité dans 8 populations ovines différentes. Une fois identifiée, j'ai établi la fréquence de la présence de chaque mutation dans les populations et leurs effets sur la physiologie de la reproduction des brebis. Ces informations sont importantes pour la gestion future des schémas de sélection.

Mots clés : Prolificité, gène majeur, ovin, ovulation, PMSG, reproduction

## General public abstract

In meat sheep, prolificacy (number of lambs per lambing) is an important technical-economic lever to improve the breeders' profitability. From a genetic point of view, mutations that have a significant effect on increasing prolificacy exist in some sheep breeds. The objective of this thesis is the identification of these prolificacy mutations in meat sheep breeds for which the presence of such mutations is statistically hypothesized. By associating genetics, high-throughput genomics, and molecular and functional biology approaches, I have identified 5 mutations (2 new, 3 already known) with major effect on prolificacy in 8 different sheep populations. Once identified, I established the frequency of the presence of each mutation in populations and their effects on the reproductive physiology of ewes. This information is important for the future management of selection schemes.

Key words: Prolificacy, major gene, ovine, ovulation, PMSG, reproduction



**ED SEVAB** : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

**UMR 1388 GenPhySE** – Génétique et Physiologie et Systèmes d'Élevage:  
24, chemin de Borde-Rouge - Auzeville Tolosane 31326 Castanet Tolosan

## Résumé

Chez les ovins allaitants, la prolificité (nombre d'agneaux par mise-bas) est un des leviers technico-économique important pour améliorer la rentabilité d'un élevage. D'un point de vue génétique, ce caractère est très peu héritable, mais des mutations ponctuelles ayant un effet important sur l'augmentation du nombre d'ovulations et de la prolificité ont été identifiées dans quatre gènes dits de fécondité (*Fec*) et nommés *FecB/BMPR1B*, *FecG/GDF9*, *FecX/BMP15* et *FecL/B4GALNT2*. L'objectif de cette thèse est l'identification de mutations de prolificités, nouvelles ou connues, principalement dans les races ovines allaitantes françaises pour lesquelles est posée une hypothèse statistique de ségrégation de telles mutations. En associant des approches de génétique, de génomique à haut-débit, et de biologie moléculaire et fonctionnelle, j'ai identifié cinq mutations à effet majeur associées à la prolificité dans huit populations ovines différentes. Toutes ces mutations affectent les gènes déjà connus, mais deux d'entre-elles sont nouvellement identifiées par cette thèse dans le gène *FecX/BMP15*. En particulier, la nouvelle mutation *FecX<sup>N</sup>* est, à la différence des 9 autres mutations prolifiques connues de *BMP15*, située dans la partie régulatrice du gène inhibant son expression.

Une fois ces mutations identifiées, l'information de fréquence de la présence de chaque mutation dans les populations et de son effet sur la reproduction des brebis doit être prise en compte pour la gestion des schémas de sélection. Dans ce cadre, j'ai particulièrement étudié la mutation *FecL<sup>L</sup>* du gène *FecL/B4GALNT2* précédemment découverte en race Lacaune et que j'ai mis en évidence dans la race Noire du Velay. La mutation *FecL<sup>L</sup>*, connue pour augmenter la prolificité des brebis de +0,45 agneaux par mise-bas, n'a pas d'impact sur le poids de naissance ou la croissance des agnelles porteuses de cette mutation. Cependant, les agnelles porteuses de *FecL<sup>L</sup>* présentent une puberté avancée de 2 mois en moyenne. Cette précocité sexuelle n'est pourtant pas expliquée par l'observation de concentrations circulantes plus faibles de deux hormones ovariennes AMH et inhibine A. De façon intéressante pour la pratique de l'insémination animale, les brebis porteuses de *FecL<sup>L</sup>* sont plus fertiles que les brebis non mutées en partie grâce à leur meilleure sensibilité à l'hormone PMSG utilisée de façon exogène pour synchroniser les ovulations.

L'ensemble de ce travail de thèse apporte de nouveaux éléments pour améliorer la gestion génétique et physiologique des populations ovines allaitantes dans lesquelles ségrégent des mutations à effet majeur sur la prolificité.

## Abstract

In meat sheep, prolificacy (number of lambs per lambing) is one of the most important technical-economic levers to improve the breeders' profitability. From a genetic point of view, this trait is lowly heritable. However, point mutations having a significant effect on increasing ovulation rate and prolificacy have been identified in four fecundity (*Fec*) genes, named *FecB/BMPR1B*, *FecG/GDF9*, *FecX/BMP15* and *FecL/B4GALNT2*. The objective of this thesis was the identification of new or already known prolificacy mutations, mainly in French meat sheep breeds for which the segregation of such mutations was statistically hypothesized. By combining genetics, high-throughput genomics, and molecular and functional biology approaches, I identified five mutations with major effect on prolificacy in eight different sheep populations. All these mutations affect the fecundity genes already known, but two of them in the *FecX/BMP15* gene are newly identified by this thesis work. In particular, the new *FecX<sup>N</sup>* mutation is, unlike the 9 other known prolific mutations in *BMP15*, located in the regulatory part of the gene inhibiting its expression.

Once these mutations are identified, the information of frequency of the presence of each mutation in the populations and the effect on the reproductive physiology of the ewes must be considered for the management of breeding schemes. In this context, I particularly studied the *FecL<sup>L</sup>* mutation of the *FecL/B4GALNT2* gene previously discovered in Lacaune sheep and that I also evidenced in the Noire du Velay breed. The *FecL<sup>L</sup>* mutation, known to increase the ewe prolificacy by +0.45 lambs per lambing, has no impact on the birth weight or growth rate of ewe lambs carrying this mutation. However, ewe lambs carrying *FecL<sup>L</sup>* have an advanced puberty of 2 months on average. This sexual precocity is however not explained by the observation of lower circulating concentrations of two ovarian hormones, AMH and inhibin A. Interestingly for the practice of animal insemination, ewes carrying *FecL<sup>L</sup>* are more fertile than non-carrier ewes partly due to their better sensitivity to the PMSG administration used to synchronize ovulations.

All of this thesis work brings new elements to improve the genetic and physiological management of meat sheep populations in which a mutation with major effect on prolificacy segregates.