



HAL
open science

Etude du gène BMP15 et de la mutation FecXN à effet majeur sur la prolificité des brebis Noire du Velay

Louise Chantepie

► **To cite this version:**

Louise Chantepie. Etude du gène BMP15 et de la mutation FecXN à effet majeur sur la prolificité des brebis Noire du Velay. Génétique animale. 2016. hal-02937903

HAL Id: hal-02937903

<https://hal.inrae.fr/hal-02937903>

Submitted on 14 Sep 2020

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

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

Institut Polytechnique Lasalle Beauvais – Esitpa
3, Rue du Tronquet – 76134 Mont Saint Aignan Cedex

« 2015 - 2016 »

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du titre d'Ingénieurs en Agriculture

**« Etude du gène *BMP15* et de la mutation *FecX^N*
à effet majeur sur la prolificité des brebis Noire du Velay »**

« Chantepie Louise »

« Encadré par »

« Fabre Stéphane – Directeur de recherche INRA »

« Gangneux Christophe – Enseignant Chercheur »

Direction des Etudes et des Formations
Centre de documentation

FICHE SIGNALÉTIQUE

PROJET INGENIEUR

AUTEUR	Louise Chantepie
TITRE EN FRANCAIS	Etude du gène <i>BMP15</i> et de la mutation <i>FecX^N</i> à effet majeur sur la prolificité des brebis Noire du Velay
TITRE EN ANGLAIS	Study of <i>BMP15</i> gene and <i>FecX^N</i> mutation with major effect on prolificacy in Noire du Velay ewes
RESUME <i>(250 mots maximum)</i>	<p>Les objectifs de ce mémoire étaient de calculer la fréquence et l'effet d'un nouveau polymorphisme SNP A>T en position OARX: 50477717 en amont du gène <i>BMP15</i> dans la race ovine Noire du Velay, appelé <i>FecX^N</i>. Mais également de déterminer la causalité de <i>FecX^N</i> qui est fortement corrélée avec des prolificités élevées chez les brebis. Grâce au développement d'un génotypage par RFLP, la fréquence allélique de <i>FecX^N</i> a été déterminé à 7%. Puis par analyse statistique, ANOVA et GLM, les effets de la mutation ont été prédit engendrant une augmentation de la taille de portée de 0,23 agneau. La mutation a été trouvé dans d'autres races, la Blanche du Massif Central et la Belle-Ile avec des fréquences alléliques chez les femelles de 2,3% et 3,2% respectivement. La mutation <i>FecX^N</i> est située avant l'ATG initiateur dans la partie non traduite du gène. D'après les résultats de PCR sur ARN rétrotranscrits elle ferait partie de la région 5'UTR de <i>BMP15</i> à la différence des autres mutations à effet majeur de prolificité situées dans la partie traduite de <i>BMP15</i>. De plus, une analyse en PCR quantitative indique que cette mutation induit une perte d'expression de <i>BMP15</i> dans l'ovocyte. Il reste à déterminer par quelle voie biologique l'expression diminue soit par un impact négatif sur la transcription/traduction ou bien, sur la régulation de l'activité promotrice du gène <i>BMP15</i>.</p>

TUTEUR DE PROJET : <i>Nom et fonction</i>	Fabre Stéphane DR2, INRA GA, HDR,
ORGANISME DE STAGE : <i>Nom et adresse</i>	INRA, UMR GenPhySE, équipe GenROC 24 chemin de Borde-Rouge - Auzeville CS 52627 31326 CASTANET-TOLOSAN CEDEX
IMPERATIF	
NOMBRE DE PAGES	
MOTS CLES SIGNIFICATIFS DU PROJET INGENIEUR <i>(10 mots clés <u>minimum</u>)</i>	Prolifécité, gène majeur, ovulation, ovin, qualités maternelles, génétique, élevage allaitant, agneaux, BMP15, Noire du Velay, agneaux, taille de portée
PI CONFIDENTIEL	✓ NON OUI
Durée de la confidentialité
Date de levée de la confidentialité

Fournir obligatoirement un CD incluant :

- **une version pdf du Projet Ingénieur,**
- **une version pdf de la fiche signalétique.**

Mentions à indiquer sur le CD : Nom et prénom de l'étudiant

Mentions à indiquer sur la pochette du CD : Nom et prénom de l'étudiant + titre du Projet Ingénieur

Projet Ingénieur non confidentiel

Nom de l'entreprise : Institut National de la Recherche Agronomique

Adresse : 24 chemin de Borde Rouge, 31326 Castanet-Tolosan

Représentée par : Stéphane Fabre

Fonction : Directeur de recherche

Titre du Projet Ingénieur : Etude du gène *BMP15* et de la mutation *FecX^N* à effet majeur sur la prolificité des brebis Noire du Velay

Autorisations d'utilisation du Projet Ingénieur

Consultation sur place :

Etudiants de Lasalle Beauvais - l'Esitpa

oui

non

Personnes extérieures

oui

non

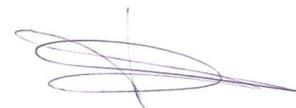
**Mention du titre du Projet Ingénieur dans une
présentation ou publication de Lasalle Beauvais
l'Esitpa**

oui

non

Date : 10/08/16

Signature



(Représentant de l'entreprise)

Adresse de correspondance :

A l'attention de Mme Maryline Testu - 3 Rue du Tronquet - CS 40118 - 76134 MONT SAINT AIGNAN CEDEX

☎ 02.32.82.91.52 - Fax : 02.35.05.27.40 - Courrier électronique : mtestu@esitpa.fr

Institut Polytechnique Lasalle Beauvais – Esitpa
3, Rue du Tronquet – 76134 Mont Saint Aignan Cedex

« 2015 - 2016 »

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du titre d'Ingénieurs en Agriculture

**« Etude du gène *BMP15* et de la mutation *FecX^N*
à effet majeur sur la prolificité des brebis Noire du Velay »**

« Chantepie Louise »

« Encadré par »

« Fabre Stéphane – Directeur de recherche INRA »

« Gangneux Christophe – Enseignant Chercheur »

Remerciements

Ce rapport est l'aboutissement de cinq années d'études en école d'Ingénieurs en Agriculture qui s'est conclue par un stage de 26 semaines au sein de l'Institut National de Recherche Agronomique de Toulouse. J'ai été encadrée par plusieurs personnes que je souhaite remercier.

Tout d'abord, Monsieur Stéphane Fabre, Directeur de recherche à l'INRA, qui été mon maitre de stage et qui a su me guider dans mes recherches. Merci pour sa patiente et sa pédagogie et également pour le temps qu'il a consacré à ce stage.

Je tiens également à remercier toute l'unité de recherche GenPhySE et plus particulièrement l'équipe GenROC qui m'a accueilli et a répondu à mes questions. Merci également à tous ceux qui m'ont aidé lors mes expériences, dans la rédaction de ce rapport et qui m'ont supporté chaque jour.

Enfin, je souhaite remercier toute l'équipe pédagogique de UniLaSalle et en particulier Monsieur Christophe Gangneux mon référent à l'école, qui a su écouter mes remarques et répondre à mes demandes.

Sommaire

I.	Introduction	1
II.	Contexte de l'étude	5
III.	But du travail et Méthodologies :	8
IV.	Matériels et méthodes :	9
1.	Les animaux.....	9
2.	La PCR, Polymerase Chain Reaction.....	9
3.	Gel d'électrophorèse	10
4.	Le génotypage KASPar	11
5.	Collecte des ovocytes	12
6.	Extraction d'ARN	13
7.	Transcription inverse	13
8.	PCR quantitative en temps réel.....	14
9.	Clonage moléculaire	15
9.a	Clonage de produits PCR en pGEM-T.	15
10.	Séquençage	16
11.	Statistiques.....	17
V.	Résultats	19
1.	Mise en place du typage RFLP pour la mutation $FecX^N$	19
2.	Fréquence de la mutation $FecX^N$ dans la population Noire du Velay.....	20
3.	Fréquence de la mutation $FecL^L$ dans la population Noire du Velay	21
4.	Effet sur la prolificité des mutations $FecX^N$ et $FecL^L$ dans la population Noire du Velay.....	21
5.	Brebis Noire du Velay hyper-prolifiques +/- aux loci N et L.....	22
6.	Ségrégation de la nouvelle mutation $FecX^N$ dans d'autres races supposées porteuses d'un gène majeur de prolificité	23
7.	Causalité de la mutation $FecX^N$	24
8.	Fonction de la mutation $FecX^N$	26
VI.	Discussion.....	28
VII.	Conclusion	33
	Bibliographie.....	35
	Annexe 1 : Liste des amorces utilisées et leur séquence	38
	Liste des tableaux	39
	Liste des figures	40
	Liste des abréviations.....	41

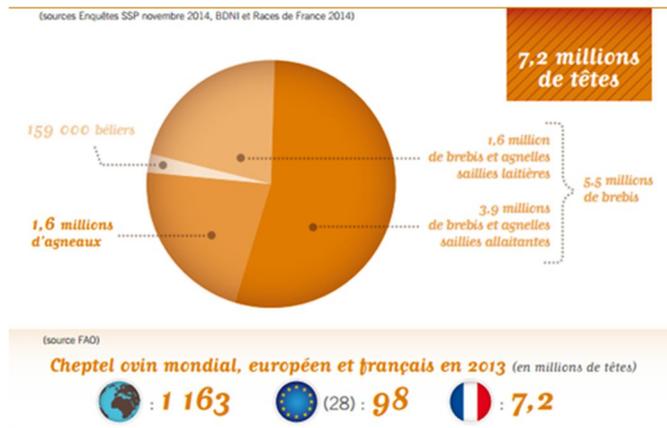


Figure 1: Répartition du cheptel ovin français.

Document INTERBEV 2015.

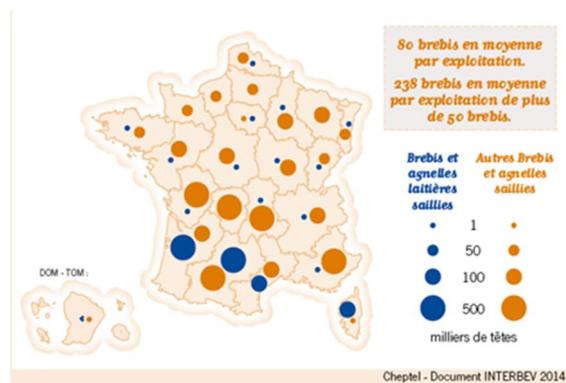


Figure 2: Répartition géographique des élevages ovins en fonction de leur taille en France.

Document INTERBEV 2015.

I. Introduction

En 2014, le cheptel ovin français comptait 7,2 millions de têtes (Figure 1) réparties sur 71 967 élevages (détenteurs d'au moins un ovin, 19 280 élevages de plus de 50 brebis). En moyenne les élevages sont de 76 brebis, et les élevages les plus importants (>500 brebis) sont situés dans la moitié sud-ouest de la France, Figure 2. On constate une forte inégalité sur la taille des exploitations pour cette filière (INTERBEV, 2015). Dans l'espèce ovine, on distingue deux filières de production, les ovins laitiers pour la production de lait et de fromage et les ovins allaitants pour la production de viande d'agneau. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous intéresserons à cette seconde filière dite allaitante qui représente plus de 65 547 élevages, mais dont le nombre d'élevages est en constante diminution et avec 2,2 millions de têtes en moins entre 2000 et 2014 (Agreste, 2015).

La production de viande ovine représente 8.5 millions de tonnes en équivalent carcasse dans le monde. La production française avec 80 000 de tonnes se situe derrière le Royaume-Uni et l'Espagne à l'échelle européenne. La Chine, avec 2 millions de tonne est le plus gros producteur de viande ovine Mondiale devant l'Europe. Pour ce qui est de la consommation de viande ovine en France, elle a chuté de 29 % entre 1990 et 2013 passant de 5.4 kg/hab/an à seulement 2,7 kg/hab/an ce qui ne représente plus que 4 % de la viande consommée. C'est donc un marché qui se dégrade.

Dans ce 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, malgré les efforts de la sélection génétique qui portent à la fois sur les aptitudes bouchères et sur les qualités maternelles. Par aptitudes maternelles, il faut comprendre la facilité d'agnelage, la capacité à nourrir les petits, la fertilité et la prolificité (nombre d'agneaux nés par agnelage). C'est la productivité numérique directement en lien avec la prolificité qui semble être un des indicateurs de productivité le plus altéré. Il est donc important de travailler sur la maîtrise de ce caractère qui est sélectionné depuis plusieurs décennies dans les races ovines.

Tableau 1: Pondération économiques et écart type génétique des caractères d'intérêt en élevage ovin.
Guerrier et al. 2010.

Caractères	Pondération €/unité	σ_G	Pondération standardisée
Fertilité (%)	0,76	10	20,7%
Prolificité (%)	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%

Tableau 2: Récapitulatif des gènes majeurs de prolificité connus ou suspectés en ovins.

	Chromosome /gène	Population
Mutations causales identifiées	5 / GDF9	Belclare (<i>FecG¹</i>)
		Thoka (<i>FecG¹</i>)
		Santa ines (<i>FecG²</i>)
		Norwegien white sheep (<i>FecG^{WW}</i>)
		Ile de France (population brésilienne) (<i>FecG⁴</i>)
	6 / BMPR1B	Mérinos Booroola (<i>FecB^B</i>)
	11 / B4GALNT2	Lacaune (<i>FecL¹</i>)
	X / BMP15	Inverdale (<i>FecX¹</i>)
		Hanna (<i>FecX¹¹</i>)
		Galway (<i>FecX¹³</i>)
		Lacaune (<i>FecX⁴</i>)
		Rasa Aragonesa (<i>FecX⁶</i>)
		Grivette (<i>FecX¹⁰</i>)
Olkuska (<i>FecX⁹</i>)		
Barbarine (<i>FecX¹²</i>)		
Belclare (<i>FecX⁸</i>)		
Evidence statistique / gène supposé	Cambridge	
	Lacaune	
	Wishart	
	Belle Ile	
	Chios	
	Loa	
	Mérinos Booroola	
	Vendéen	
	Noire du Velay	
	Woodland	
	Metherell	

En effet, 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).

Cependant, la prolificité est un caractère polygénique faiblement héritable, ne permettant que des gains génétiques faibles et lents en sélection. En effet le caractère est géré par plein de gènes à petits effets. Cependant, la prolificité montre une variabilité génétique importante ($\theta G=16$; Tableau 1). En effet, il peut exister une grande disparité entre les animaux, certains 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 de l'effet très important de mutations dans des gènes uniques : les gènes majeurs de prolificité (ou « Fecundity *Fec* gene » en terminologie anglo-saxonne, pour revue (Fabre et al., 2006)).

La première mise en évidence de la transmission monogénique de la prolificité date de 1980 par l'observation d'une forte fréquence de femelles très prolifiques dans l'élevage Booroola de race Mérinos en Australie et montrant un nombre d'ovulations élevés par endoscopie. Sur la base d'études de parenté prenant en compte le taux d'ovulation, l'hypothèse d'un gène majeur cause d'une hyperprolificité a été avancée (Davis, Montgomery, Allison, Kelly, & Bray, 1982). L'identification d'un polymorphisme unique de type SNP (single nucleotide polymorphism) localisé dans le gène *BMPR1B* (Bone Morphogenetic Protein Receptor 1B ou encore appelé *FecB*) porté par le chromosome 6 a confirmé cette hypothèse 20 ans après (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001; Wilson et al., 2001).

Par la suite, la recherche de gènes majeurs et leurs mutations affectant la prolificité s'est élargie à de nombreuses populations ovines en s'appuyant sur des méthodes de génétique quantitative et moléculaire. Comme on peut le voir dans le Tableau 2, de nombreuses mutations à effet majeur sur la prolificité ont été mises en évidence ou bien supposées. Hormis celle dans *BMPR1B* et celle récemment décrite dans *B4GALNT2* (beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2 ou *FecL* ; (Drouilhet et al., 2013), la très grande majorité de ces mutations sont positionnées sur le chromosome X et plus particulièrement dans le gène *BMP15* (Bone Morphogenetic Protein 15, aussi appelé *FecX*) et sur le chromosome 5 dans le gène *GDF9* (Growth and Differentiation Factor 9 ou *FecG*).

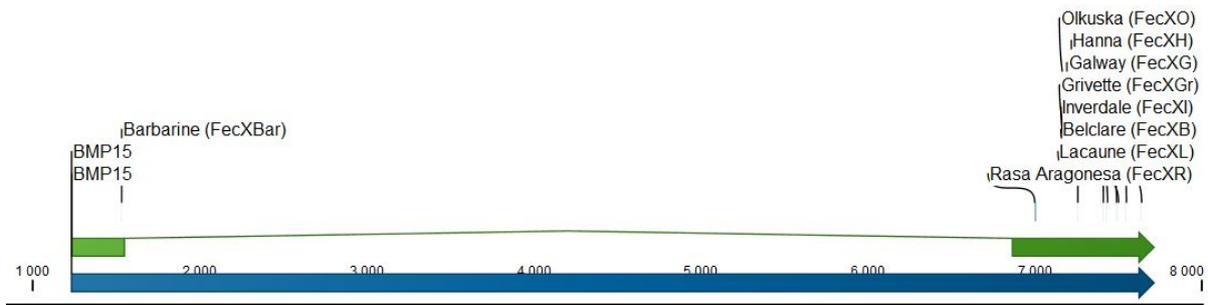


Figure 3: Répartition des mutations de prolificité sur le gène *BMP15*.
Image obtenue avec CLC Main Workbench 7.7.1.

En bleu est représenté le gène *BMP15*.

En vert sont représentés les exons sur l'ARN de *BMP15*.



Figure 4: Répartition des mutations de prolificité sur le gène *GDF9*.
Image obtenue avec CLC Main Workbench 7.7.1.

En bleu est représenté le gène *GDF9*.

En vert sont représentés les exons sur l'ARN de *GDF9*.

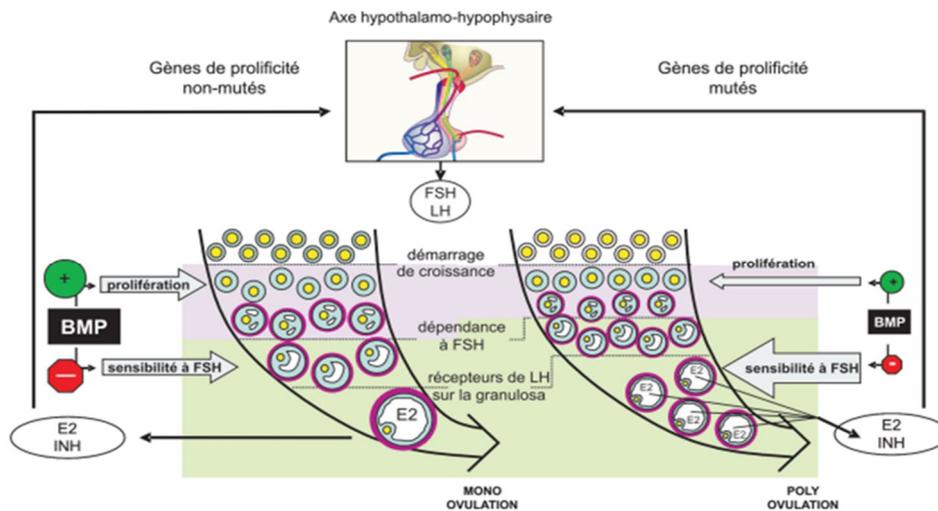


Figure 5: Conséquence des mutations des gènes de prolificité sur la folliculogénèse et le nombre d'ovulations chez la brebis.
Monniaux et al. 2009.

L'activité réduite du système de signalisation des Bone Morphogenetic Proteins (BMP) chez les brebis porteuses de mutations dans les gènes de prolificité *BMP15*, *GDF9* ou *BMPR1B*, conduit à diminuer l'action des BMPs, d'une part sur la prolifération 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'œstradiol 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 prolificité.

E2= Œstradiol, INH= inhibine.

Comme on peut le voir dans la Figure 3 et la Figure 4, toutes ces mutations sont situées dans les exons de ces deux gènes et affectent négativement les séquences protéiques qui en découlent. En effet, les protéines *BMP15* et *GDF9* mutées perdent tout ou partie de leur fonction biologique dans les ovaires des brebis prolifiques (Fabre et al., 2006). Cet effet « négatif » est paradoxal puisque au final on obtient un avantage productif pour la brebis mutée.

Ainsi, d'un point de vue scientifique, la découverte des gènes majeurs de prolificité et de l'effet « négatif » de leurs mutations a permis de mieux appréhender le fonctionnement ovarien et plus particulièrement le rôle du système des Bone Morphogenetic Protein (BMP) dans les processus d'ovogénèse et de folliculogénèse ovarienne chez la brebis. En effet, la prolificité est directement en lien avec le nombre de gamètes femelles (ovocyte) ovulées. D'après Monniaux et al., 2009, le système BMP et en particulier les gènes *BMP15*, *GDF9* et *BMPR1B* se comportent comme des inducteurs de la folliculogénèse précoce en favorisant la prolifération des cellules folliculaires. Par contre, lors des phases plus tardives de maturation folliculaire sous contrôle des hormones gonadotropes hypophysaires (FSH, LH), ces gènes sont un frein à ce développement. Cet équilibre contrôle le développement et l'ovulation d'un seul follicule chez les espèces essentiellement mono-ovulantes comme la brebis. Ces effets sont illustrés et commentés dans la Figure 5 (schéma de gauche). Mais lorsque les gènes du système BMP sont mutés et leurs activités réduites, l'étape de folliculogénèse précoce est freinée donnant des follicules plus petits, mais l'étape tardive ne subit plus de frein et les follicules mûrent plus tôt. Cependant, chacun de ces petits follicules matures ne produit pas assez de signaux hormonaux (estradiol et inhibine) pour informer l'hypophyse de générer la décharge ovulatoire de LH. Il faut donc qu'ils soient plusieurs pour atteindre la même concentration circulante de ces hormones que celle fournie par l'unique gros follicule non muté. Ainsi, lorsque l'équilibre hormonal est atteint, tous les follicules matures vont ovuler sous la décharge de LH et on obtient ainsi une poly-ovulation (Figure 5 schéma de droite). Si tous (ou partie) les ovocytes ovulés sont fécondés alors la prolificité augmente.

D'un point de vue génétique, la gestion de ces gènes majeurs, dans les populations où ils ont été découverts, est maintenant un enjeu important des schémas de sélection des ovins allaitants. L'objectif est d'atteindre un optimum pour la rentabilité économique des élevages. Cependant, pour pouvoir gérer ces gènes majeurs dans les populations, il faut connaître deux paramètres importants, la fréquence de la mutation dans la population et l'effet de l'allèle prolifique sur le nombre d'agneaux nés. A titre d'exemple dans le schéma de sélection OVI-TEST (<http://www.lacaune-ovitest.com/>) destiné aux élevages de Lacaune, la fréquence d'animaux porteurs de la mutation prolifique *FecL^L* (gène *B4GALNT2*) est de 30% chez les femelles (2% d'homozygotes) et 32% chez les mâles (3% d'homozygotes). *FecL^L* a un effet sur la production de +1,5 ovocytes et +0,5 agneaux par mise-bas pour les brebis hétérozygotes (L/+) (Drouilhet et al., 2009 ; Martin, Raoul, & Bodin, 2014).

A l'état hétérozygote, toutes les mutations connues dans les gènes *Fec* induisent une augmentation du nombre d'ovulations et de la prolificité. Cependant, il existe un décalage numérique entre le nombre d'ovulations observées et la prolificité comme indiqué ci-dessus en Lacaune (+1,5 ovocytes mais uniquement +0,5 agneau). On peut expliquer ce phénomène par des pertes embryonnaires et de la mortalité périnatale. Cette différence est plus fortement marquée par l'état homozygote de certaines mutations (dans *FecB* ou *FecL*) qui augmentent encore plus le nombre d'ovulations mais assez peu la prolificité, avec plus de mortalité périnatale (Hinch et al., 1985). Certaines autres mutations (en particulier dans *FecX/BMP15* et *FecG/GDF9*) conduisent même à de la stérilité à l'état homozygote.

Au final, ces phénotypes d'hyper-ovulation ou de stérilité ne sont pas bien acceptés par la filière et les éleveurs. Il est donc nécessaire de gérer ces mutations à l'état hétérozygote. C'est ce qui a été choisi par OVI-TEST. Sur la base des données de fréquence et d'effet, l'objectif est d'obtenir 50 % des agnelles de renouvellement porteuses hétérozygotes de la mutation prolifique *FecL^L* en race Lacaune viande. Sur ce modèle, les études technico-économiques réalisées indiquent en moyenne un gain de revenu de 21€ par agnelage et par brebis, soit une augmentation de 12% de la marge brute (Communication personnelle B. Giral directrice d'OVI-TEST).

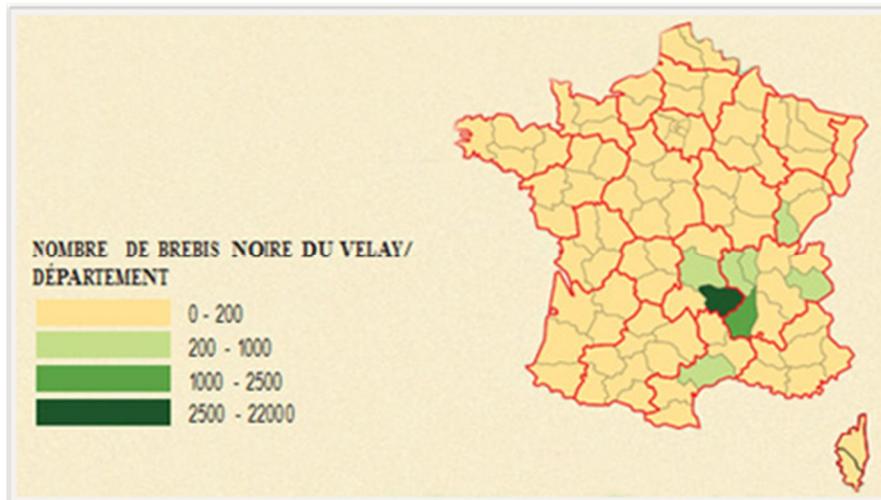


Figure 6: Répartition du nombre de brebis Noire du Velay par département.

Races ovines des Massifs (<http://www.races-ovines-des-massifs.com/fr/description-races/noire-velay/origine-standard.php> ; consulté en Avril 2016).



Figure 7: Brebis standard de race Noire du Velay.

Races ovines des Massifs (<http://www.races-ovines-des-massifs.com/fr/description-races/noire-velay/origine-standard.php> ; consulté en Avril 2016).

II. Contexte de l'étude

Dans ce contexte de sélection génétique de la prolificité et de recherche de mutations causales affectant ce caractère de production, les données de mise-bas de toutes les races ovines allaitantes françaises (en contrôle de performance) ont été analysées (données de la base ovins allaitants, OVAL, hébergées au Centre de Traitement des Informations Génétiques, CTIG). Cette analyse de données a été réalisée par L. Bodin du laboratoire INRA GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage). Elle était basée sur une étude de la moyenne et l'écart-type de prolificité naturelle (non induite par hormones) de chaque race, la moyenne et la répétabilité individuelle de cette prolificité pour chaque brebis et sur l'ascendance paternelle (repérer un ou des béliers dont la moitié des filles sont très prolifiques et l'autre moitié peu prolifique). C'est ainsi que la race Noire du Velay est apparue comme une bonne candidate. En effet, les animaux Noire du Velay sont connus pour leur forte prolificité avec une moyenne de 1,71 agneaux par mise bas (Source : Bilan du contrôle de performances ovins allaitant, Tiphine & IDELE, 2015).

La race Noire du Velay trouve son origine dans les plateaux de Haute-Loire (Figure 6) La tête et le corps sont noirs avec des reflets ardoise et sa toison va du noir mal teint à reflets brunâtres au noir franc (Figure 7). Elle est recherchée pour ses facultés d'adaptation aux conditions climatiques rigoureuses et sa bonne valorisation de surfaces peu productives. Elle permet également de dessaisonner facilement les agnelages ce qui assure la production et la commercialisation d'agneaux en contre-saison. Cependant elle est de qualité bouchère moyenne mais sa bonne prolificité répond très bien à la pratique de croisements terminaux avec des races lourdes comme l'Île de France pour la production d'agneaux. (« Origine et standard de la Noire du Velay - Races ovines des massifs », 2016)

Lors d'une étude génétique précédente, l'équipe d'accueil GenROC (Génomiques des Ruminants Ovins Caprins) avait identifié certaines brebis Noire du Velay prolifiques comme porteuses de la mutation *FecL^L* dans *B4GALNT2* portée sur le chromosome 11 précédemment identifiée en race Lacaune (Drouilhet et al., 2013). De cette découverte a découlé un génotypage (repérage génétique) systématique des animaux Noire du Velay dans le noyau de sélection.

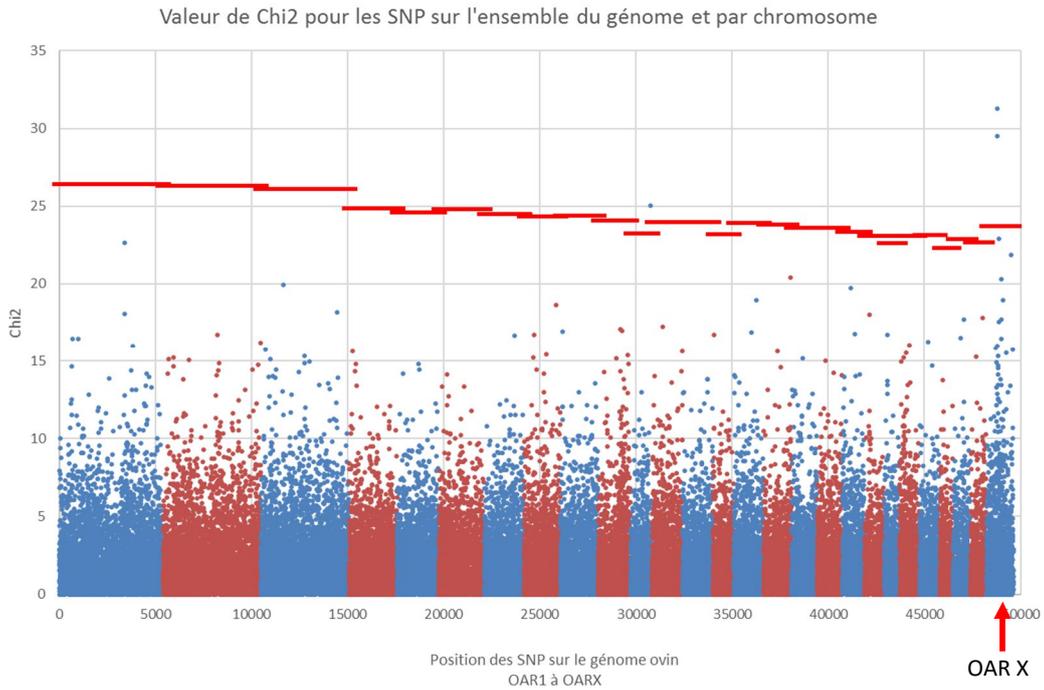


Figure 8: Valeur du test Chi2 pour chaque SNP positionné le long du génome ovin (version 3.1).

En bleu, les valeurs de Chi2 pour les SNP des chromosomes : 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, X.
 En rouge, les valeurs de Chi2 pour les SNP des chromosomes : 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26.
 Les lignes rouges représentent les seuils de significativité du test à l'échelle de chaque chromosome.

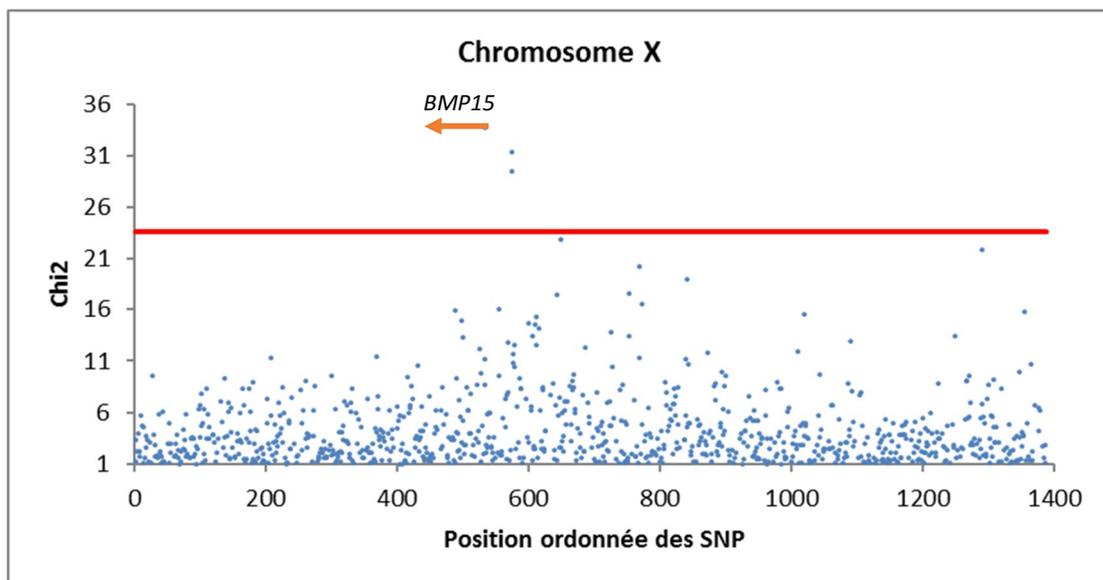


Figure 9: Valeurs de test Chi2 des SNP du chromosome X, un signal significatif à proximité des coordonnées du gène candidat BMP15.

La ligne rouge représente le seuil de significativité du test à l'échelle du chromosome X.

Par la suite, j'indiquerai par ++ les animaux non porteurs de mutations ; par L+ les animaux hétérozygotes pour la mutation *FecL^L* et par LL les porteurs homozygotes. De façon très étonnante, certaines brebis étaient plus performantes que ce qu'indiquait leur génotype. En effet, des brebis de génotype ++ au locus *FecL* (donc prédites pour être peu prolifiques) pouvaient avoir des portées répétées de 3 ou 4 agneaux. Après analyse statistique de toutes les brebis ++, l'hypothèse de la ségrégation d'un deuxième gène majeur est avancée. Toutes les autres mutations déjà connues ont été testées sans résultats. Il est alors envisagé qu'une nouvelle mutation soit présente dans cette population en plus de la mutation *FecL^L*.

Afin de trouver cette nouvelle mutation une analyse statistique d'association entre le phénotype prolifique et 50 000 marqueurs de type SNP répartis sur tout le génome ovin a été engagée. Pour ce faire les ADNs génomiques extraits de 150 brebis Noire du Velay ++ au locus L (50 peu prolifiques 1.2 en moyenne, 100 très prolifiques 2.2 en moyenne) ont été génotypés par l'outil génomique « puce 50kSNP ovins » (OvineSNP50 Genotyping BeadChip – Illumina). Un test statistique de Chi2 évalue l'association de chaque allèle de chaque SNP au caractère « peu » ou « très » prolifique. Les valeurs de chaque test sont données pour chaque SNP positionnés sur le génome en fonction des chromosomes (Figure 8). Par le phénomène de « déséquilibre de liaison » plus la mutation causale est près d'un des marqueur SNP de la puce, plus le signal sera fort. Si c'est une mutation unique à effet majeur alors on observe qu'un seul signal significatif. La Figure 9 montre un unique signal sur le chromosome X à proximité d'un gène candidat, *BMP15*. Fort de ces résultats, les génomes de deux brebis très prolifiques et d'une brebis peu prolifique ont été analysés par séquençage complet à haut-débit NGS (Next-Generation Sequencing, Illumina HiSeq2500).



Figure 10: Résultats de séquençage haut débit de 3 brebis Noire du Velay. Les deux brebis prolifiques ont un SNP T>A, coordonnées génomiques OARX : 5047717 en amont du gène BMP15 OARX : 50970938-50977454.

Image obtenue avec Integrative Genomics Viewer.

La brebis numéro 600086 est homozygote variante, la numéro 050496 est hétérozygote et la numéro 860413 est homozygote identique à la séquence de référence.

Par comparaison de ces séquences dans la région du gène *BMP15*, on voit dans la Figure 10 qu'il existe un SNP T>A en amont du gène *BMP15* qui est présent uniquement dans le génome des deux brebis prolifiques et absent chez la brebis peu prolifique. Ce SNP candidat porte les coordonnées génomiques OARX : 50477717 sur la version 3.1 du génome ovin de référence.

Le gène *BMP15* étant sur le brin complémentaire du chromosome X ovin, par la suite j'indiquerai le SNP en complémentaire A>T dans la séquence conventionnelle 5'→3' du gène *BMP15*. On notera ainsi *FecX^N* l'allèle « muté » Noire du Velay (nucléotide T) de ce SNP dans le gène de fécondité *BMP15* sur le chromosome X. L'allèle sauvage (nucléotide A) sera noté *FecX⁺*. Ainsi, une brebis de génotype homozygote non-porteuse de la mutation sera notée +/+ (en séquence A/A), une brebis hétérozygote N/+ (en séquence T/A) et une brebis homozygote mutée N/N (en séquence T/T). La mutation étant sur le chromosome sexuel X, le génotype hémizygoté des mâles sera +/Y ou N/Y.

III. But du travail et Méthodologies :

Dans ce contexte, mon stage s'inscrit dans l'étude génétique et biologique de ce polymorphisme *FecX^N* avec deux objectifs principaux menés en parallèle :

- Un objectif génétique : établir la fréquence et l'effet sur la prolificité de l'allèle « muté » *FecX^N* dans la population de brebis Noire du Velay
- Un objectif biologique : prouver que l'allèle « muté » *FecX^N* est causal d'un dysfonctionnement du gène *BMP15*.

Dans le cadre de l'objectif génétique, il faut tout d'abord mettre au point un test fiable de génotypage rapide pour *FecX^N* à moindre coût de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) associant amplification PCR et digestion enzymatique. Il faut disposer de prises de sang fournissant le matériel génétique pour ces génotypages en nombre important pour qu'ils puissent être représentatifs de la population réelle. Enfin il faut disposer des données phénotypiques de prolificité (taille de portée à chaque mise-bas) pour chaque animal (données du CTIG) et discriminer de l'autre mutation *FecL* présente dans la population. Les analyses statistiques adéquates sont réalisées pour obtenir les fréquences alléliques de N et de L et l'effet des allèles sur la prolificité. La réalisation de cet objectif va directement concerner les éleveurs ainsi que les organismes de sélection afin de réfléchir et d'adapter leurs prochains croisements.

L'objectif biologique sera mené de façon à comprendre si et comment l'allèle « muté » *FecX^N* affecte le fonctionnement du gène *BMP15*. Je mettrai en œuvre des approches de biologie moléculaire comme l'analyse de l'expression des ARN messagers et le clonage moléculaire. La réalisation de cet objectif devrait permettre de répondre à la question de la causalité de cette mutation pour amorcer l'explication physiologique de l'hyper-prolificité des brebis Noire du Velay mutées.

IV. Matériels et méthodes :

1. Les animaux

Pour répondre à la partie génétique, un grand nombre de prélèvements est nécessaire. Les échantillons sanguins de brebis Noire du Velay ont été prélevés dans le cadre d'un autre projet mené par l'équipe (DEGERAM, Développement de la Génomique des Races de Massifs). Ce projet avait pour objectif de génotyper la mutation *FecL* dans la population. Au total, ce sont 1231 animaux (1155 femelles et 76 mâles) qui ont été prélevés pour un échantillon de sang à la veine jugulaire. Chaque échantillon est identifié par le numéro national de l'animal ce qui permet la mise en relation des données génétiques et phénotypique (la prolificité). Ces données sont disponibles dans la base de données OVALL au CTIG.

Pour la partie biologique, après génotypage au locus *FecX^N*, 4 brebis Noire de Velay ont été achetées chez les éleveurs. Deux d'entre elles avec le génotype homozygote sauvage +/+ (nées l'une 2008 et l'autre en 2012) et les deux autres homozygotes mutées N/N (nées en 2008). Ces 4 brebis sont de génotype +/+ au locus *FecL*. Ces animaux ont été euthanasiés pour prélever les ovaires et plus particulièrement les ovocytes sites de l'expression de *BMP15*. Ces euthanasies ont été réalisées au sein de l'Installation Expérimentale INRA de Langlade (agrément C314290) dans le cadre de l'autorisation de projet d'expérimentation animale n°01171.02 « Déterminisme génétique de la prolificité en races ovines » suite à l'avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animal numéro 115.

2. La PCR, Polymerase Chain Reaction

La PCR est une technique de réplication et d'amplification ciblée de l'ADN *in vitro*. Elle permet à partir de quelques molécules d'obtenir une quantité importante d'un fragment ciblé d'ADN. Le ciblage est obtenu par un couple d'oligonucléotides (environ 20 nucléotides) qui s'hybride de façon spécifique à chaque extrémité du segment d'ADN à amplifier. Une ADN polymérase réplique l'ADN cible entre ces deux amorces oligonucléotidiques.



Figure 11: Positionnement des amorces PCR sur le gène BMP15 afin d'étudier le polymorphisme FecX^N.

Image obtenue avec CLC Main Workbench.

Pour cela plusieurs étapes sont nécessaires à la réalisation d'un cycle :

- La dénaturation, les liaisons entre les nucléotides de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN ;
- L'hybridation, les amorces vont s'apparier aux bases complémentaires. La température d'hybridation est fonction de la longueur et de la séquence des amorces ;
- L'élongation, les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire. La durée de l'élongation est dépendante de la taille du fragment.

A chaque cycle de réplication, la quantité d'ADN du fragment augmente de deux fois.

Dans le cas de la mutation *FecX^N* les amorces spécifiques de la zone du gène *BMP15* ovin ont été positionnées de part et d'autre du polymorphisme (Figure 11). Elles sont choisies en fonction de leur caractéristique d'hybridation grâce au logiciel PRIMER 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Une température d'hybridation de 58°C ± 2°C, une taille comprise entre 18 et 22 paires de bases (pb) et celle des amplicons entre 150 et 1500 pb en fonction des besoins. La liste de différentes amorces utilisées et leur séquence sont disponibles en Annexe 1.

La PCR peut être réalisée directement sur quelques microlitres de sang complet sans extraction préalable de l'ADN génomique grâce au kit KAPA Blood PCR (Kapa Biosystems). Alternativement, lorsqu'un ADN purifié est disponible la PCR est réalisée classiquement dans un volume de 25µl à partir de 5µl d'ADN à 10ng/µl. Le milieu de réaction est composé de 1.25 µl de chaque amorce (10µM) précédemment choisie, de dNTP Mix (2.5µl à 10nM), de 0,5 unité de Taq polymérase (GoTaq, Promega) et de 5µl son tampon 5X.

3. Gel d'électrophorèse

Le gel d'électrophorèse est un gel d'agarose qui permet de séparer des fragments d'ADN chargés négativement en fonction de leur poids moléculaire sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules de plus petites tailles migrent plus rapidement vers la cathode et plus loin que celles de tailles supérieures. Pour réaliser les gels, on utilise de l'agarose de 0.8 à 2% (m/v) dans un tampon de migration TBE Tris/Borate/EDTA (107.8 g / 55.0 g / 0.58 g) 10X (Eurobio-lifesciences) dilué à 1X dans de l'eau bi-distillée ultra pure.

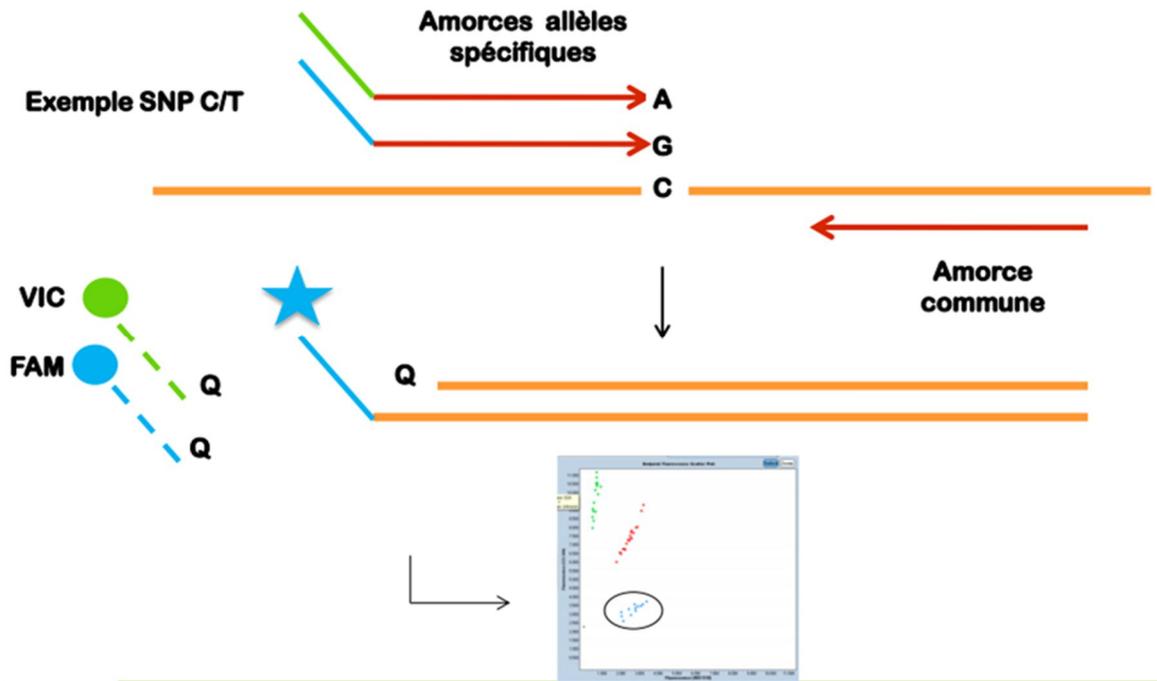


Figure 12: Principe du génotypage KASPar allèle spécifique.

A chaque version du polymorphisme est attribué une amorce spécifique avec une queue fluorescente FAM ou VIC, ici bleu ou vert.

FAM : $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ (absorption) = 494 ; $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ (émission) = 518 ; E at $\lambda_{\text{max}} = 68000$.

VIC : $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ (absorption) = 538 ; $\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$ (émission) = 554.

La fluorescence est quantifiée par ordinateur créant des nuages de point et le génotypage des individus.

E : coefficient d'extinction .

Plus le fragment à visualiser est petit, plus on augmente le pourcentage d'agarose pour rendre le gel discriminant. La poudre d'agarose est dissoute grâce à la chaleur (four micro-onde). Après avoir laissé le mélange refroidir ($\pm 50^{\circ}\text{C}$), on ajoute 1 goutte de bromure d'éthidium (BET, Sigma), un agent intercalant de l'ADN qui devient fluorescent sous l'action des ultraviolets (UV).

L'agarose refroidie est coulée dans un moule muni de peignes pour créer des puits permettant d'y déposer les échantillons et un marqueur de taille. Le gel est alors déposé dans une cuve remplie au préalable de TBE 1X et est relié à un générateur. On laisse migrer pendant environ 30 min à 190V. Le gel est sorti de la cuve pour être posé sur une table UV. Grâce au BET on visualise chaque échantillon. Le gel est pris en photo (noir et blanc) afin de pouvoir analyser les résultats.

4. Le génotypage KASPar

La technique du KASPar (Kompetitive Allele Specific PCR) est une technique de génotypage par amplification PCR spécifique d'allèle en détection de fluorescence (Cuppen et al., 2007), Figure 12. 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). 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.

Le génotypage KASPar s'effectue dans une plaque 384 puits. On réalise tout d'abord un mix amorces de volume final à 100 μl :

- 5813540_UpT (amorce allèle spécifique) = 12 μl à 100 μM
- 5813540_UpA (amorce allèle spécifique) = 12 μl à 100 μM
- 5813540_Dnbis (amorce commune) = 30 μl à 100 μM
- H₂O = 46 μl

Pour un échantillon d'ADN à une concentration de 10ng/ μl , on a besoin de 1,25 μl auquel on ajoute 2,5 μl KASP V4.0 2x Master mix (LGC), 0,07 μl du mix amorces et 1,43 μl d'eau pour un volume réactionnel final de 5 μl / échantillon.

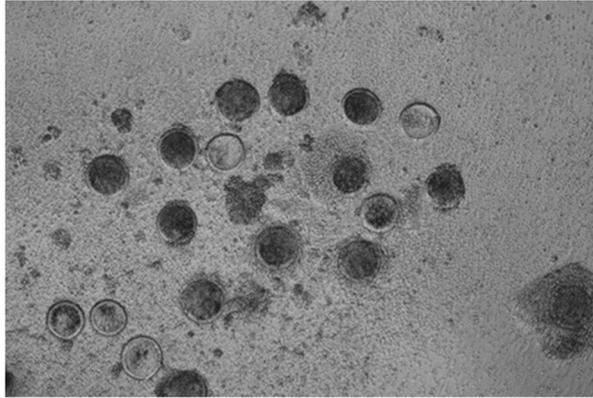


Figure 13: Ovocytes de brebis au milieu de cellules folliculaires de la granulosa (objectif x10).

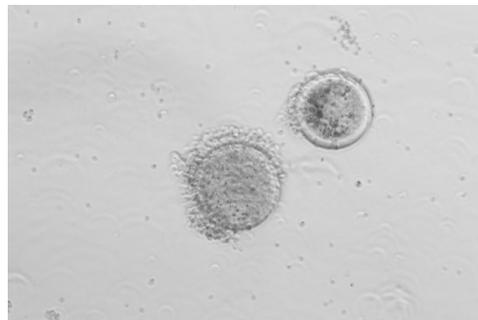


Figure 14: Ovocyte entouré par une couronne de cellules de granulosa (objectif x20).



Figure 15: Ovocyte intègre et dénudé (objectif x20).

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).

5. Collecte des ovocytes

Lors de l'arrivée des brebis, une endoscopie a été réalisée afin de vérifier leur nombre d'ovulations et donc leur cyclicité. La cyclicité de chaque brebis étant avérée, des éponges vaginales de progestagène (Fluorogestone Acétate, 20mg, Intervet) ont été posées afin de synchroniser leur cycle œstrien. Après 14 jours les éponges sont retirées et les animaux euthanasiés 36 h plus tard pendant la phase folliculaire du cycle (avant l'ovulation) afin de collecter les ovaires. Les ovaires de chaque brebis sont placés dans du milieu liquide McCoy (Sigma) et transportés à température ambiante au laboratoire (20 min).

Les ovaires sont disséqués pour rendre apparent les follicules rendus translucides sur une source lumineuse. Tous les follicules compris entre 1 et 3mm de diamètre sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille (0,45x10mm, 26G, BD Microlance) montée sur une seringue à insuline de 1ml. Les ponctions sont regroupées par 5 ou 10 follicules dans une goutte de 100µl de milieu McCoy. On observe alors chaque goutte sous loupe binoculaire pour repérer les ovocytes au milieu des cellules folliculaires de la granulosa (Figure 13). Par la suite, on cherche à obtenir des ovocytes sans cellule de granulosa par bain successif dans des gouttes de milieu McCoy et un bain terminal de 100µl de PBS 1X (Gibco, Life Technologies).

Dans un premier temps, on récupère des ovocytes entourés par une couronne de cellules de granulosa (le cumulus) comme indiqué dans la Figure 14. Grâce à des pipetages répétés ils sont dénudés (Figure 15). Pour finir, les ovocytes sont regroupés par lots de 5 et par brebis dans quelques µl et placés dans des tubes de 2ml et congelés à -80°C.

NucleoSpin® principle


 DNA/RNA
 contaminants
 Sample lysis, release of DNA/RNA from cells, tissue, etc.


 DNA/RNA is bound to the silica membrane under high-salt conditions
 Interaction between DNA/RNA (hydrate shell is reversibly removed by chaotropic salt) and silica membrane


 Contaminants are washed away under high-salt and/or ethanolic conditions to keep the DNA/RNA bound to the membrane


 DNA/RNA is eluted in low-salt buffer or water, DNA/RNA is ready to use for downstream applications

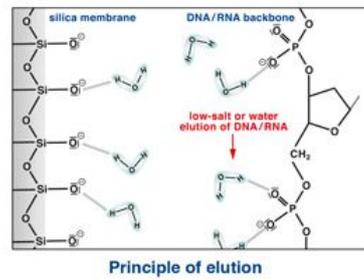
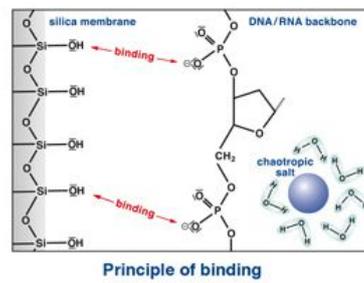


Figure 16: Principe de fonctionnement du kit d'extraction d'ARN.

Image issue de la notice NucleoSpin RNA Macherey-Nagel.

6. Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN ovocytaire se fait à l'aide du Kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel) dont le principe de fonctionnement est décrit dans la Figure 16. L'un des aspects les plus importants d'isolement des ARN est d'empêcher leur dégradation au cours de la procédure d'isolement. Les ovocytes sont lysés par incubation dans une solution contenant de grandes quantités d'ions chaotropes. Ce tampon de lyse permet d'inactiver les RNases, qui sont présents dans pratiquement tous les matériaux biologiques et cela permet de créer des conditions de liaison appropriées qui favorisent l'adsorption de l'ARN à une membrane de silice. L'ADN contaminant, qui est également lié à la membrane de silice, est éliminé par une solution de rDNase. Deux étapes de lavage avec des tampons différents permettent l'élimination des sels, métabolites et macromoléculaires cellulaires. L'ARN pur est finalement élué dans des conditions de faible force ionique grâce à de l'eau RNase-free. Les quantités d'ARN issues de 5 ovocytes étant tellement faibles, il est impossible de les doser par spectrométrie. Nous parlerons alors d'équivalent ovocyte. Une fois extrait, les ARN sont stockés à -80°C pour une conservation à long terme.

7. Transcription inverse

La transcription inverse ou retro-transcription (RT) est comme son nom l'indique la réaction inverse de la transcription. C'est la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN. On obtient le brin d'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN qui contient uniquement les exons car les introns ne font pas partie de l'ARN. Grâce à la PCR on peut amplifier les fragments d'intérêts de la même façon qu'à partir de l'ADN génomique.

La rétro-transcription des ARN ovocytaires est effectuée à l'aide du kit de transcriptase inverse Superscript II (SSII, Invitrogen). Les échantillons d'ARN ovocytaires (1,25 équivalent ovocyte soit 5µl) sont dénaturés dans un volume de 12,5µl à 65°C pendant 5 min en présence de l'oligonucléotide T22V (1µl à 10µM) et de dNTP (10mM).

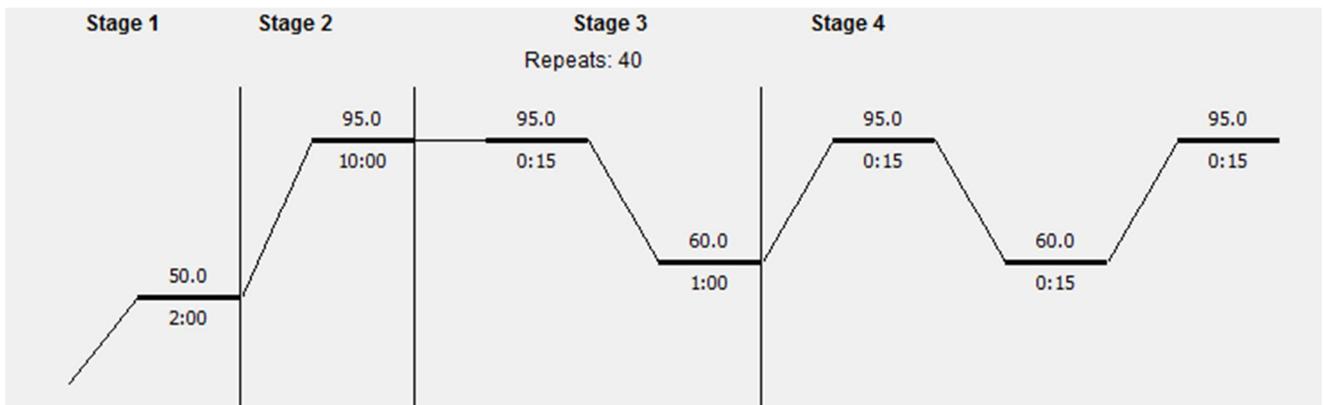


Figure 17: Programme utilisé par le thermocycleur lors des PCR quantitative en temps réel.

Au-dessus des traits gras sont indiquées les températures, en dessous les temps aux différentes températures.

L'oligonucléotide T22V (22 bases T précédées d'une base A, G ou C) est utilisé comme amorce pendant la rétro-transcription. Il est ancré au niveau de la jonction 3'UTR-queue polyA des ARN. Une fois la dénaturation terminée, on ajoute 4µl de 5X First-Strand Buffer, 2µl de Dithiothreitol (DTT 0.1M), 0,5µl de RNAsine (Rnase Inhibitor 40UI/µl, Promega) ainsi que 1µl de l'enzyme SuperScript II pour un volume réactionnel final de 20µl. L'ensemble est incubé à 42°C pendant 50min pour la synthèse des ADNc. L'inactivation de l'enzyme a lieu à 70°C pendant 15min. En fin de réaction les ADNc sont dilués 5 fois par ajout de 80µl d'H₂O et stockés à -20°C.

8. PCR quantitative en temps réel

Le principe de base est similaire à une PCR classique réalisée sur les ADNc provenant de la rétro-transcription des ARNm. Le dessin des amorces pour les gènes choisis est effectué par le logiciel Beacon Designer 8.12 (Premier Biosoft). Les amorces sont positionnées le plus possible en 3' et doivent s'hybrider en position inter-exonique. Cela permet de pouvoir discriminer les amplifications d'ADN génomique non souhaitées des amplifications réelles d'ARNm, qui sont plus courtes car ne contenant pas d'intron. Dans le but d'augmenter l'efficacité et la spécificité d'amplification des amorces, le logiciel tient compte des structures secondaires des ARNm (appariement de séquences palindromiques) et des portions de séquences homologues à d'autres transcrits.

Une réaction utilise 3µL d'ADNc issu de la rétro-transcription diluée au 1/5 jusqu'au 1/80 en fonction des besoins. Les ADNc sont mélangés à 1µl de chaque amorce sens et anti-sens (3µM, décrites dans l'annexe 1) et 5µl de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) contenant l'ADN polymérase et un intercalant fluorescent, le SYBR Green. Chaque réaction de PCR est opérée en duplica dans des plaques opaques 384 puits à l'aide du thermocycleur ABI 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems) selon un programme spécifique de dénaturation, hybridation et élongation représenté dans la Figure 17. L'analyse des résultats se fait à l'aide du logiciel SDS 2.4 (Applied Biosystems).

Concrètement, plus on amplifie l'ADN, plus l'intensité de la fluorescence due au SYBR Green est importante. L'automate enregistre en temps réel la fluorescence à chaque cycle d'amplification.

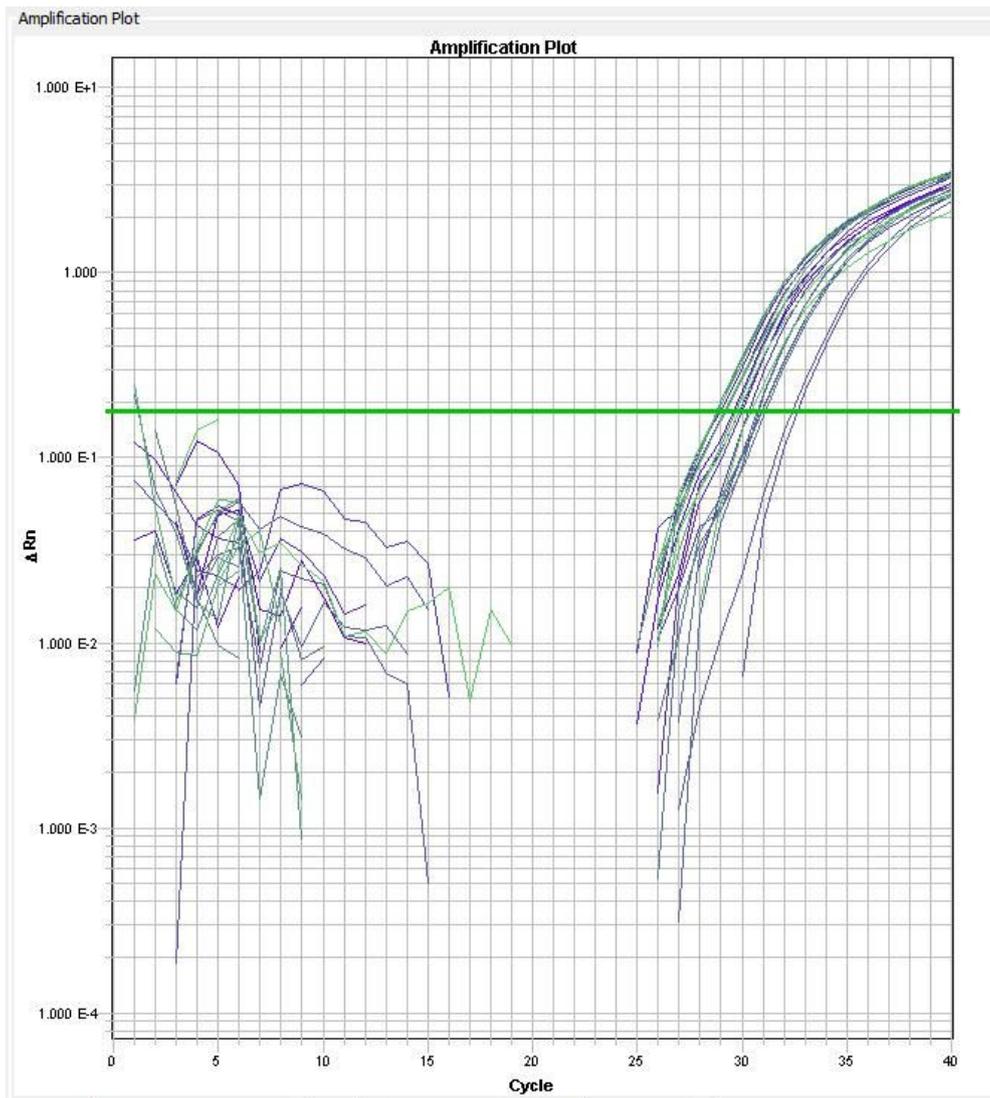


Figure 18: Exemple de courbe obtenue comme résultat d'une PCR quantitative en temps réel.

Sous le logiciel SDS 2.4 (Applied Biosystems)

La ligne verte représente le seuil au-delà duquel l'amplification PCR suit une loi de croissance exponentielle.

Pour chaque puit, il détermine en fin de réaction le Ct (Cycle threshold) qui est cycle seuil au-delà duquel l'amplification du signal suit une loi de croissance exponentielle, dépassant le bruit de fond (Figure 18). Ainsi on obtient une valeur de Ct pour chaque gène d'intérêt dans chaque échantillon biologique. Cette valeur de Ct sert à évaluer l'accumulation des ARNm d'intérêt (ici *BMP15* et *GDF9*) relativement à un gène contrôle d'expression ubiquiste rendant compte des quantités globales d'ARNm de l'échantillon. Ce gène contrôle est le gène *RPL19*. Pour chaque échantillon, ce rapport d'expression relative est le suivant : $R = \frac{E_{RPL19}^{Ct(RPL19)}}{E_{gène}^{Ct(gène)}}$, E étant l'efficacité d'amplification PCR. Pour une efficacité théorique de 100%, E est égale à 2 (doublement du produit de la PCR à chaque cycle). Le résultat du calcul expérimental d'Efficacité pour *BMP15*, *GDF9* et *RPL19* est donné dans la partie Résultats.

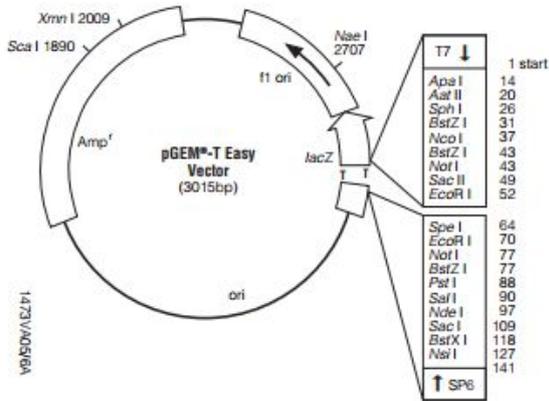
9. Clonage moléculaire

La technique de clonage moléculaire consiste à insérer par ligation un fragment d'ADN linéaire, par exemple tout ou partie d'un gène d'intérêt ou de ses produits (ici *BMP15*) dans un ADN circulaire plasmidique bactérien (vecteur) préalablement ouvert. La transformation de cette construction de clonage par pénétration à l'intérieur de bactéries dites compétentes, va permettre la sélection et la multiplication du plasmide ainsi construit.

9.a Clonage de produits PCR en pGEM-T.

Le clonage dans un vecteur pGEM-T (Promega) permet spécifiquement le clonage de produit de PCR. Le vecteur pGEM-T est vendu prélinéarisé par l'enzyme EcorV et une thymidine T est ajoutée aux extrémités 3' pour accueillir par ligation (T4 DNA ligase) les produits PCR qui possède par défaut une base A complémentaire ajoutée par la Taq polymérase. Le vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase. L'insertion du fragment PCR dans ce plasmide inactive le gène *lacZ*, la bactérie est alors incapable de produire de la β -galactosidase. Les colonies qui produisent cette enzyme prennent une couleur bleue en présence du substrat X-Gal alors que les non-productrices sont blanches. La sélection des clones recombinants s'effectue sur milieu LB-agar additionné d'ampicilline, d'IPTG et de X-Gal à 100 μ g/ml chacun.

pGEM[®]-T Easy Vector Circle Map and Sequence Reference Points



pGEM[®]-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–128
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	139–158
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	176–197
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operator	200–216
β -lactamase coding region	1337–2197
phage f1 region	2380–2835
<i>lac</i> operon sequences	2836–2996, 166–395
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2949–2972
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2999-3

Figure 19: Représentation circulaire du vecteur pGEM-T Easy et site multiple de clonage.

La réaction de ligation est réalisée dans un volume de 10µL, 50ng de vecteur avec le produit de PCR dans un ratio de 3/1 (insert/vecteur) avec 5µl de 2X Rapid Ligation Buffer et 1µl de T4 DNA Ligase (3U/µl) (Promega). Le vecteur pGEM-T contient deux sites d'initiations de la transcription, SP6 et T7 (Figure 19). Ces sites pourront être utilisés avec le kit TnT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) afin d'étudier le fonctionnement de la mutation *FecX^N*.

10. Séquençage

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. 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 Alcaline 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 modifiées 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).

11. Statistiques

Le génotypage des allèles N et L dans la population Noire du Velay a permis d'obtenir les fréquences alléliques et les effectifs de chaque génotype. La déviation d'équilibre à la loi d'Hardy-Weinberg entre effectifs observés et effectifs théoriques est réalisée par un test de Chi2 (3,84 à 1 degré de liberté pour $p=0.05$). L'équation d'Hardy-Weinberg est la suivante $p^2+2pq+q^2=1$ où p est la fréquence de l'allèle dominant et q la fréquence de l'allèle récessif tel que $p+q=1$. La loi suppose que les fréquences alléliques restent constantes de génération en génération en absence d'autres influences évolutives.

L'effet des allèles N ou L sur la prolificité a été testé soit avec une analyse de variance ANOVA pour un effet simple du génotype (logiciel PRISM6, GraphPad Software) soit avec une procédure GLM (General Linear Models) à l'aide du logiciel SAS qui permet d'analyser des données déséquilibrées (effectif différent dans chaque génotype par exemple), comparaisons multiples, variances multivariées, etc... Le modèle complet utilisé est le suivant :

$$TP = Elv + An + Sai + Age + Me + MN + Mill + FecL * FecX + Anim + \epsilon$$

- TP = taux de prolificité
- Elv= élevage, $n = 13$
- An = année de la mise bas, $n = 11$ de 2006 à 2016
- Sai = Saison de lutte $n = 3$
 - Printemps → Lutte en Janvier, Février, Mars, Avril ; Mise bas en Juin, Juillet, Août, Septembre
 - Eté → Lutte en Mai, Juin, Juillet, Août ; Mise bas en Octobre, Novembre, Décembre, Janvier
 - Automne → Lutte en Septembre, Octobre, Novembre, Décembre ; Mise bas en Février, Mars, Avril, Mai

- Age = Age à la mise bas, n=12 <14, 14 -17, 18-21, 22-26, 27-29, 30-35, puis tous les ans
- MN = Mode de naissance, n = 3 (mère née de portées simple, double ou triple)
- ME = Mode d'élevage, n = 3 (mode d'allaitement : sous la mère, adopté, artificiel)
- Mill = Année de naissance n =6 :2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2012
- *FecL*= le génotype pour la mutation Lacaune ; n = 3 : ++, L+, LL
- *FecX*= le génotype pour la mutation Noire du Velay ; n = 3 : +/+, N/+, N/N
- Anim = Animal considéré comme un facteur aléatoire
- ε = effet résiduel intra-animal

L'effet du génotype N/N sur les données d'expression de *BMP15* et *GDF9* dans les ovocytes par RT-qPCR a été analysé par Test-T de Student sur des valeurs répétées non appariées grâce au logiciel PRISM6 (GraphPad Software).

Toutes les données sont représentées par la moyenne et l'écart type. Pour tous les tests statistiques, les différences sont significatives à $p < 0,05$.

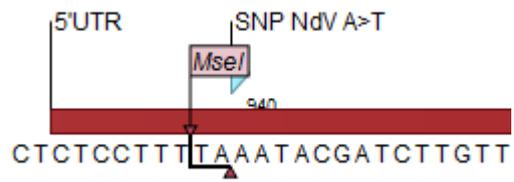


Figure 20: Site de coupure théorique par l'enzyme MseI lié à l'absence de la mutation FecX^N.

Image obtenue avec CLC Main Workbench

V. Résultats

1. Mise en place du typage RFLP pour la mutation *FecX^N*

A la suite de la mise en évidence du polymorphisme SNP OARX:50477717 A>T en amont du gène *BMP15* par le séquençage haut-débit (Figure 10, page7), nous avons développé un test de génotypage spécifique de ce SNP par la technique de la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Elle a été choisie pour son coût réduit en comparaison du séquençage. Le coût de séquençage d'un échantillon est de 1€ correspondant aux frais de machine et du mélange Big Dye de réaction contre 21 centimes, coût de l'enzyme en RFLP. Cette technique est basée sur la digestion d'un fragment issu de PCR par une enzyme de restriction de l'ADN (ciseaux moléculaire). 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.

Pour la mutation *FecX^N*, le SNP A>T de la séquence fait « disparaître » un site de restriction spécifique *MseI* identifié grâce au logiciel CLC Main Workbench 7 (CLC Bio, Qiagen). En théorie, l'enzyme *MseI* (Figure 20) permet de couper entièrement l'ADN chez les animaux homozygotes +/+ au site 5'-T/TAA-3', mais le site muté par le SNP 5'-T/TAT-3' n'est plus reconnu chez les animaux homozygotes N/N et l'ADN ne sera pas coupé. Par la PCR on cible la zone contenant le SNP et l'unique site de restriction de *MseI* grâce aux amorces SNP50977717_BMP15_R et SNP50977717_BMP15_F choisies avec le logiciel PRIMER3. Le fragment PCR amplifié de 341 paires de base est contrôlé par migration sur gel d'agarose à 2% en déposant 5µl des 20µl de la réaction PCR. Cinq µl restant sont digérés par l'enzyme *MseI* (0,2µl à 10 U/µl, New England Biolabs) en présence de 2µl du tampon de digestion 10X dans un volume final de 20µl. Le résultat de la digestion (1 nuit à 37°C) est contrôlé par migration de 10µl de la réaction sur gel d'agarose 2%.

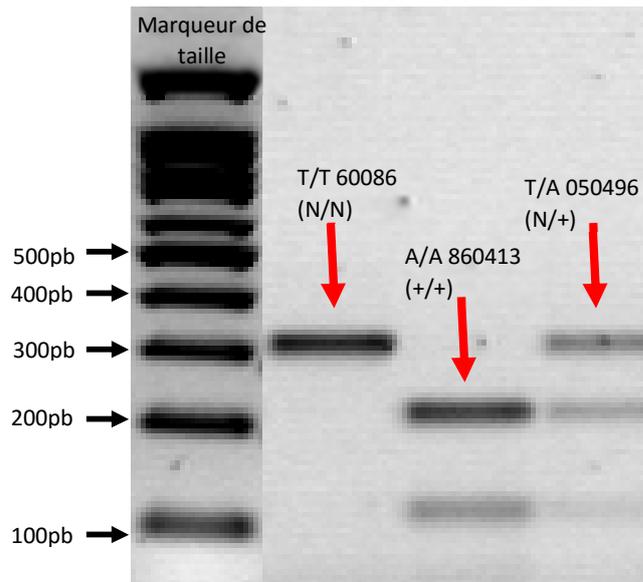


Figure 21: Résultat sur gel d'agarose de la digestion par l'enzyme *MseI* après PCR sur les 3 brebis témoins pour la mutation *FecX^N*.

Tableau 3: Test d'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg sur 1151 femelles Noire du Velay au locus *N*.

Génotypes	Observé #	Attendu #
Homozygote reference:	986	990,1
Hétérozygote:	163	154,9
Homozygote variant:	2	6,1
Freq allèle variant	0,07	

$$X^2 = 3,159707372$$

$$X^2 \text{ test } P \text{ value} = 0,075477 \text{ avec 1 degré de liberté.}$$

Si $P < 0.05$ - non conforme équilibre HW

On peut observer théoriquement 3 combinaisons de longueur de fragment à partir de la PCR digérée :

- 1 fragment de 341pb, pas de coupure : SNP homozygote T/T = animal de génotype N/N
- 2 fragments, coupure totale, 189pb et 152pb : SNP homozygote A/A = animal de génotype +/+
- 3 fragments, 241pb, 189pb et 152pb : SNP hétérozygote A/T = animal de génotype +/N

Nous avons génotypé par ce test les 3 animaux utilisés pour le séquençage NGS et dont nous connaissons le génotype afin d'avoir des références. Dans la Figure 21, il apparaît bien que le test prédit exactement les bons génotypes, l'animal 860413 est +/+, le 050496 est +/N et le 600086 est N/N.

Pour génotyper l'ensemble des animaux disponibles avec ce test j'ai utilisé des plaques PCR 96 puits. Elles permettent de génotyper 95 animaux en une seule fois, le 96ème puit étant le témoin de contamination de la réaction PCR et ne contient pas d'échantillon mais de l'eau en présence du mélange de réaction PCR. Pour tous les échantillons d'une même plaque, la même préparation du mélange réactionnel de PCR puis de digestion est utilisée limitant ainsi les biais.

2. Fréquence de la mutation *FecX^N* dans la population Noire du Velay

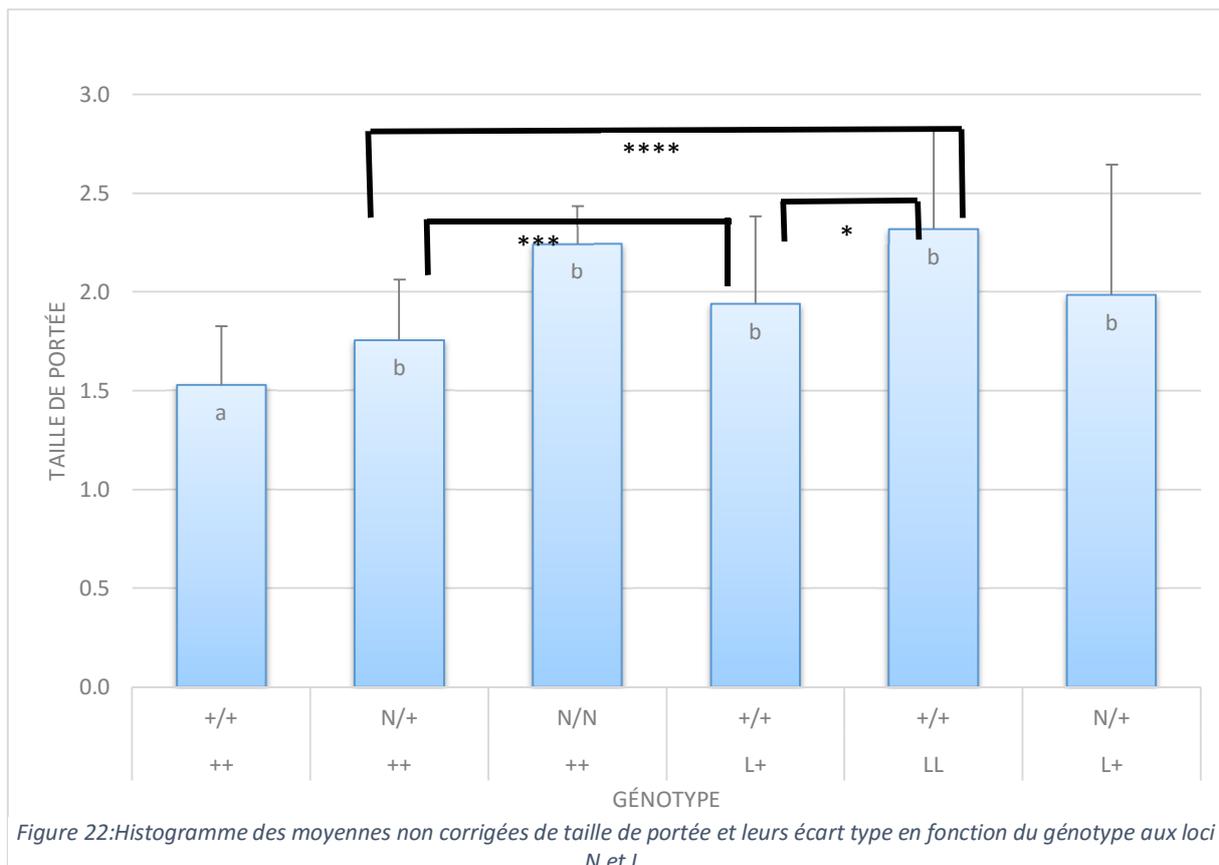
Les 1231 échantillons de sang Noire du Velay disponibles ont été génotypés par la technique RFLP suite à une PCR KAPA pour le SNP OARX:50477717 A>T. Parmi ces échantillons, j'ai obtenu tous les génotypages pour les 76 béliers et 11 se sont avérés porteurs hémizygotes (Y/N) de la mutation soit 14,5%. Parmi les femelles, j'ai obtenu un résultat clair pour 1151 sur 1155. Quatre échantillons n'ont pas pu être génotypés de par une mauvaise qualité des prélèvements sanguins. Au sein de ces femelles 163 sont hétérozygotes N/+ (14,2%) et 2 sont homozygotes N/N (0,2%), ce qui porte la fréquence de l'allèle muté N à 7,2% dans cet échantillon de femelles. Avec cette information de fréquence nous avons cherché à savoir si la présence de l'allèle muté dans la population Noire du Velay respectait l'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg (Tableau 3). Le test de Chi2 n'apparaît pas significatif (p=0,07), l'équilibre d'Hardy-Weinberg est donc respecté.

Tableau 4: Test d'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg sur 1148 femelles Noire du Velay au locus L.

Génotypes	Observé #	Attendu #
Homozygote reference:	925	924,1
Hétérozygote:	210	211,7
Homozygote variant:	13	12,1
Freq allèle variant		0,10

$\chi^2 = 0,077714745$
 χ^2 test P value = **0,780419** avec 1 degré de liberté.

Si $P < 0.05$ - non conforme équilibre HW



a vs. b $p < 0,05$ (test ANOVA)

Différence significative pour $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{***}$; $p < 0,0001^{****}$ (Test ANOVA)

Cependant, la p-valeur est très proche de 0,05 car nous observons en particulier un manque d'animaux homozygotes mutés (n=2) par rapport à l'attendu (n=6).

3. Fréquence de la mutation *FecL^L* dans la population Noire du Velay

Comme indiqué dans l'introduction, la mutation prolifique *FecL^L* dans le gène *B4GALNT2* ségrége également dans la population Noire du Velay. Depuis sa découverte, elle est génotypée systématiquement à la plateforme LABOGENA de Jouy en Josas (<http://www.labogena.fr/>). Sur les 1231 échantillons à ma disposition, 1120 femelles avaient le génotype disponible au locus L dans la base OVALL. Pour les 35 femelles sans information et les 76 mâles j'ai utilisé le génotypage KASPar du locus L déjà développé dans l'équipe d'accueil. J'ai obtenu le génotypage L pour 103 animaux, le génotype d'un seul bélier et 7 brebis n'ayant pas pu être obtenu.

Ainsi, sur les 1148 femelles avec information au locus L, 210 brebis sont hétérozygotes +/L (16,3%) et 13 sont homozygotes L/L (1,1%). La fréquence de L est ainsi de 10% dans cette population de femelles. Le test de Chi2 n'apparaît pas significatif (p=0,78), l'équilibre d'Hardy-Weinberg est donc respecté (Tableau 4). Pour les mâles, sur les 75 animaux j'observe 18 porteurs hétérozygotes +/L (24%) et aucun L/L.

Avec cette information au deux loci N et L, 18 brebis sont double porteuses hétérozygote N/+₋+/L et deux mâles N/Y₋+/L.

4. Effet sur la prolificité des mutations *FecX^N* et *FecL^L* dans la population Noire du Velay

Pour estimer l'effet des deux allèles mutants N et L, nous avons dans un premier temps sélectionné parmi notre liste de 1155, toutes les femelles avec une information de génotype aux deux loci N et L, puis recherché celles dont l'information de prolificité est disponible dans la base OVALL et enfin nous avons trié celles qui ont une information sur au moins 3 mise-bas sur cycle naturel (sans utilisation d'hormones). Ainsi une information fiable de prolificité et de génotype est disponible pour 919 brebis. L'histogramme des moyennes de taille de portée et leur écart type en fonction du génotype est présenté dans la Figure 22. Une analyse statistique simple par analyse de la variance ANOVA de l'effet du génotype indique un effet significatif de N et de L par rapport aux brebis non porteuses +/+. L'allèle N permet une augmentation de 0,23 point contre 0,4 pour l'allèle L à l'état hétérozygote. La mutation *FecL* est de façon significative plus forte que la mutation *FecX^N* avec une différence de +0,18 agneau.

Tableau 5: Répartition des mises bas en fonction du génotype de 919 femelles Noire du Velay.

Génotype	++	L+	LL	Total
+/+	4346	816	37	5199
N/+	881	71		952
N/N	18			18
Total	5245	887	37	6169

Tableau 6: Effet de la mutation *FecX^N* sur la taille de portée pour 756 femelles Noire du Velay *FecL⁺* avec un modèle GLM.

Génotype		Effectif	Moyenne ajustée	Tests des différences		
Locus L	Locus N			+/+ vs. N/+	N/+ vs. N/N	+/+ vs. N/N
++	+/+	631	1,50			
++	N/+	123	1,69	0,19 **		
++	N/N	2	2,00		0,31 NS	0,50**

** , p<0,01 ; NS : non significatif

Tableau 7: Effet de la mutation *FecL* sur la taille de portée pour 780 femelles Noire du Velay *FecX⁺* avec un modèle GLM.

Génotype		Effectif	Moyenne ajustée	Tests des différences		
Locus L	Locus N			++ vs. L+	L+ vs. LL	++ vs. LL
++	+/+	631	1,50			
L+	+/+	141	1,93	0,143**		
LL	+/+	8	2,42		0,49 **	0,92 **

** , p<0,001

Tableau 8: Données phénotypiques et généalogiques de brebis très prolifique mais sauvage aux deux loci *FecX^N* et *FecL^L*.

Identifiant animal (ego)	<i>FecL</i>	<i>FecX^N</i>	Identifiant Père	Identifiant Mère	Prolif	mb1	mb2	mb3	mb4	mb5	mb6
32561900001	++	+/+	.	32561960154	3.00	1	3	4	1	4	5
32561730102	++	+/+	32995010033	32561710239	2.75	2	4	3	2	.	.
32533690202	++	+/+	.	43078139040392	2.75	4	2	3	2	.	.
32551330066	++	+/+	32544010057	32551360158	2.50	3	2
32533630172	++	+/+	32561700047	32533600234	2.50	3	2
32517360577	++	+/+	.	43030006040025	2.40	1	3	4	2	2	.

Prolif : prolificité moyenne ; mn : mise bas.

Les cases en rouge indiquent des portées triples ou plus.

Les brebis double mutantes à l'état hétérozygote ont une prolificité moyenne légèrement supérieure à des N/+ (+0,2) et des L+ (+0,4), ce qui permet d'obtenir une prolificité de 1,94 en moyenne. Une moyenne de prolificité supérieur à 2 est obtenue avec les génotype N/N (2,25) et L/L (2,32).

Dans le modèle statistique plus complet nous avons mis en relation d'autres critères d'élevage en plus du génotype pouvant avoir un effet sur la taille de portée comme on peut le voir dans l'équation présentée (Cf. Matériels et Méthodes) :

$$TP = Elv + An + Sai + Age + Me + MN + Mill + FecL * FecX + Anim + \epsilon$$

Les 919 femelles génotypées ayant au moins 3 mises-bas sont utilisées dans le modèle. Ceci représente 6169 mises-bas sur l'ensemble des enregistrements en Juillet 2016 OVALL, soit en moyenne 6,7 mises bas par femelles (Tableau 5). La moyenne générale de prolificité calculée sur toutes ces mises-bas est de 1,64. La variance expliquée par le modèle est de 20,3% (variance totale = 0.4280 et variance résiduelle = 0,3409). La répétabilité est assez faible, 0,07 (Variance anim = 0,02461) car on ne tient pas compte des relations de parenté.

On observe un gain significatif de 0,19 agneau pour des brebis N/+_+/+ (Tableau 6). Les brebis +/+_L/+ ont une différence significative de +0,5 avec les brebis non porteuses de *FecL* ou de *FecX^N*. Cette différence est deux fois plus importante à l'état homozygote muté avec +0,9 pour des LL (Tableau 7). Si on étudie l'interaction entre les deux gènes, il n'y a pas de différence entre des brebis +/+_L/+ et brebis N/+-L/+. Cependant en présence de N, l'effet de L est fortement diminué avec seulement +0,23 contre +0,4 seul.

5. Brebis Noire du Velay hyper-prolifiques +/+ aux loci N et L.

Lors de l'analyse des données de génotypages, certaines femelles très prolifiques se sont avérées non porteuses des deux mutations connues dans la race. Dans le Tableau 8 sont représentées les 5 femelles les plus prolifiques. J'ai décidé de séquencer l'ADN disponible de 3 femelles : 00001 (Prolif=3), 90202 (Prolif=2,75) et 60577 (Prolif=2,4) pour les gènes *BMP15* et *GDF9* car ils sont porteurs du plus grand nombre de mutations causales identifiées pour la prolificité.

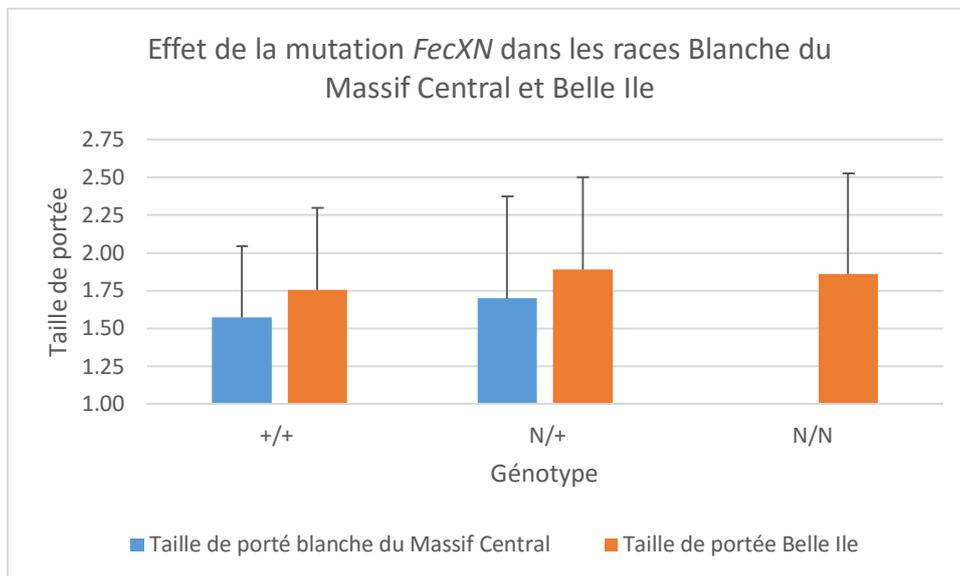


Figure 23: Effet de la mutation *FecX^N* sur la taille des portées dans les populations Blanche du Massif Central et Belle-Ile (moyenne \pm Ecart-type).

Des SNP ont été identifiés sur les séquences de ces 3 animaux uniquement dans le gène *GDF9*. Ces SNP sont déjà connues dans d'autres races telles que Olkuska, Cambridge et Belclare mais n'ont pas révélé d'action sur la prolificité (Demars et al., 2013; Hanrahan et al., 2004).

Il s'agit des SNP suivants dont les coordonnées génomiques sont données par alignement sur la version 3.1 du génome ovin de référence :

- Olkuska-G1 OAR5:41843262 (G>A) pour les femelles 90202 et 00001 à l'état hétérozygote
- G2 OAR5:41841919 (C>T), G3 OAR5:41841925 (G>A), G4 OAR5:41841679 (G>A) pour les 3 femelles, à l'état hétérozygote pour 90202 et 00001 et homozygote muté pour 60577

6. Ségrégation de la nouvelle mutation *FecX^N* dans d'autres races supposées porteuses d'un gène majeur de prolificité

Dans de nombreuses races, il a été remarqué par analyse statistique l'évidence d'un gène majeur de prolificité mais pas encore identifié. Des échantillons d'ADN étaient disponibles, nous avons donc fait des test RFLP pour identifier la présence ou non de *FecX^N* dans certaines de ces races. Pour les populations Belges, Vlams et Swifter (12 échantillons) et Française Ile-de-France (79 échantillons), la nouvelle mutation n'a pas été trouvée. A contrario, des animaux porteurs de la mutation *FecX^N* ont été découverts dans deux races françaises Blanche du Massif Central (439 échantillons testés) et en Belle-Ile (199 échantillons testés). Dans la population Blanche du Massif Central, la fréquence de l'allèle mutant est de 2,3% chez les femelles et de 3,4% chez les mâles. Chez les Belle Ile l'allèle muté est présent à 3,2% chez les femelles et n'a pas été trouvé chez les mâles prélevés.

Les effets de la mutation dans ces deux populations sont présentés dans la Figure 23. Dans les deux populations, les brebis hétérozygotes N/+ ont en moyenne 0,13 agneau supplémentaire par rapport aux brebis +/+ (effets non significatif, Test-T de Student pour deux génotypes ou ANOVA pour trois génotypes). En Blanche du Massif Central, aucune moyenne de prolificité n'est encore disponible pour des brebis N/N, on ne peut donc pas connaître l'effet de deux copies d'allèle mutant.

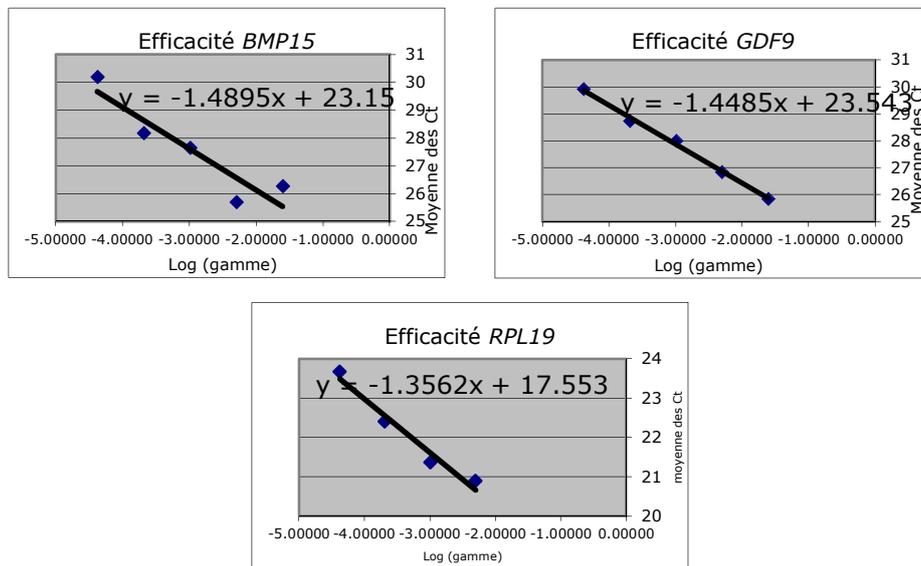


Figure 24: Courbes d'effacités des couples d'amorces pour les 3 gènes utilisés en qPCR.

7. Causalité de la mutation *FecX^N*

Les différentes analyses de fréquence et d'effet de la mutation *FecX^N* permettent de déduire que le SNP OARX :50477717 T>A constitue un très bon marqueur génétique pour une sélection sur la prolificité en race Noire du Velay. L'étape suivante est de comprendre l'impact d'un unique changement de nucléotide sur le fonctionnement du gène candidat *BMP15* voisin. Ce SNP ne se situe pas à l'intérieur du gène dans la séquence codante traduite en protéine comme c'est le cas de toutes les mutations connues de ce gène affectant la prolificité (Tableau 2, page 2). De par sa position en amont du gène *BMP15*, nous avons émis l'hypothèse d'une altération de l'expression du gène en présence de l'allèle variant N.

Pour tenter de valider cette hypothèse, j'ai réalisé une étude de quantification de l'accumulation des ARNm de *BMP15* et de son homologue *GDF9* dans les ovocytes de brebis par RT-qPCR en temps réel. Pour cela, nous avons collecté des ovocytes à partir des ovaires de 4 brebis Noire du Velay, 2 +/+ et 2 N/N. Une observation préalable par endoscopie de ces brebis a montré que les brebis +/+ avaient deux corps jaunes chacune alors que les N/N avait respectivement 4 et 6 corps jaunes. Cette différence nous conforte dans l'idée que la mutation augmente le nombre d'ovulations par cycle.

J'ai constitué plusieurs lots de 5 ovocytes par brebis (répliques biologiques) pour extraire les ARN. Sur tous ces lots, j'ai réalisé 2 transcriptions inverses indépendantes afin d'obtenir des ADNc (répliques techniques). A partir de ces échantillons indépendant d'ADNc, j'ai constitué un échantillon « mélange » pour établir les efficacités d'amplification des couples d'amorces utilisés pour *BMP15*, *GDF9* et le gène de référence *RPL19*.

Cette efficacité se calcule à partir d'une analyse de l'expression de chaque gène en qPCR à partir de 5 dilutions sériées du mélange d'ADNc (1/5, 1/10, 1/20, 1/40 et 1/80) testées en double. Les résultats de Ct pour chaque réaction sont mis en relation avec le logarithme de la dilution, et la pente de la droite tracée permet de calculer l'efficacité d'amplification selon la formule suivante $E : e^{(-1/pente)}$ (Figure 24). Ainsi, les efficacités pour les trois gènes se sont avérées satisfaisantes en étant proche de 2 et permettant donc une bonne quantification relative des ARNm (*BMP15* : 1,96 ; *GDF9* : 1,99 ; *RPL19* : 2,09).

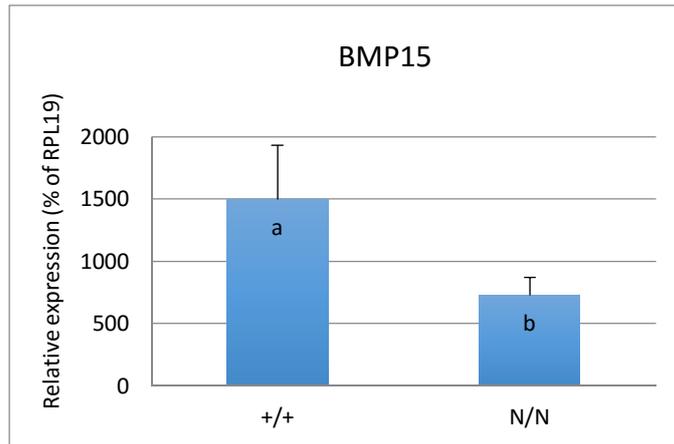


Figure 25: Résultat de la PCR quantitative en temps réel sur l'expression relative de BMP15 en pourcentage de RPL19 dans des ovocytes en fonction du génotype au locus N.

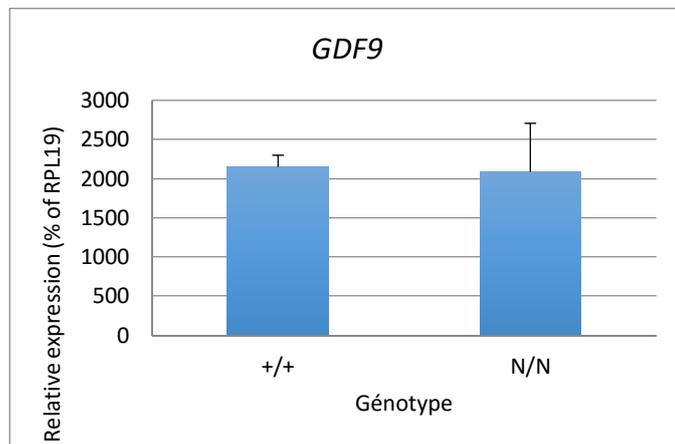


Figure 26: Résultat de la PCR quantitative en temps réel sur l'expression relative de GDF9 en pourcentage de RPL19 dans des ovocytes en fonction du génotype au locus N.

Une fois l'efficacité établie, j'ai pu quantifier pour chaque échantillon de 5 ovocytes l'expression relative de *BMP15* et *GDF9* en pourcentage de l'expression de *RPL19*. Les résultats sont présentés dans les Figures 25 et 26. Lorsque l'on regarde les résultats de l'expression de *BMP15*, on note une différence entre les deux génotypes testés ($p < 0,05$, Test-T de Student). Pour les brebis mutés N/N, l'expression de *BMP15* est 2 fois plus réduite que chez les brebis de génotype sauvage +/+. On en déduit que la mutation est associée à une perte d'expression du gène *BMP15* dans les ovocytes lorsque la mutation *FecX^N* est présente. Par contre, l'expression de l'autre gène ovocytaire de prolifération *GDF9* est identique quel que soit le génotype des animaux au locus N.

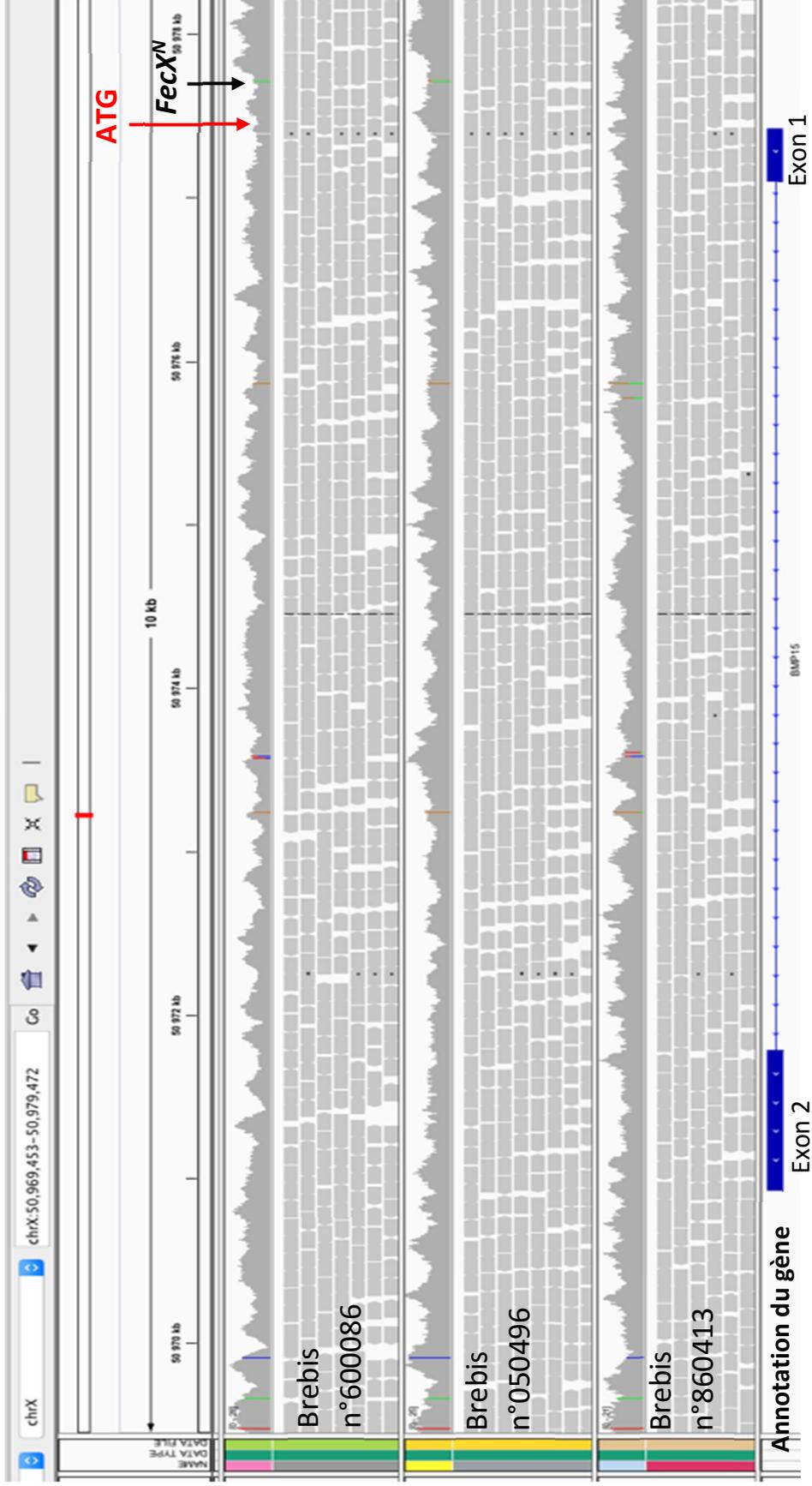


Figure 27: Annotation sur le brin complémentaire du gène BMP15 sous le logiciel IGV avec la version 3.1 du génome ovin.

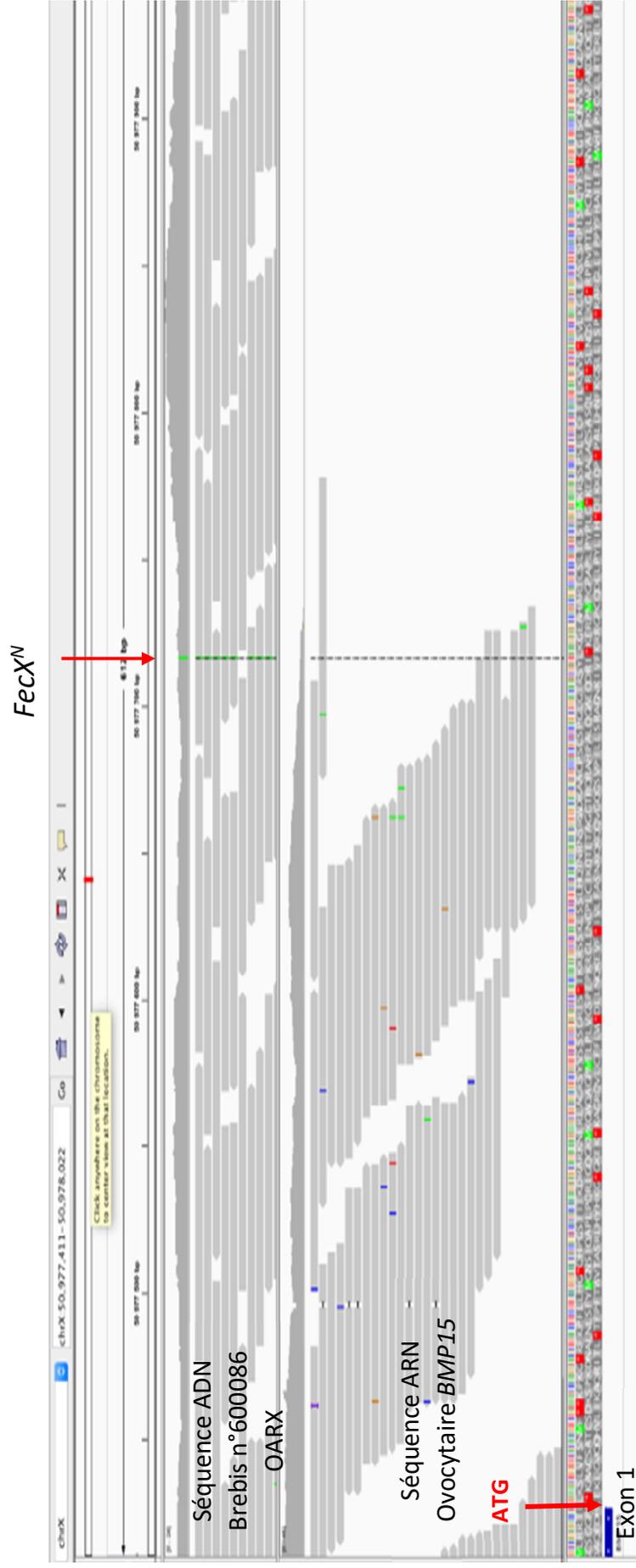


Figure 28: Alignement de lectures ARN de BMP15 sur le génome ovin et positionnement de la mutation FecX^N sous le logiciel IGV avec la version 3.1 du génome ovin.

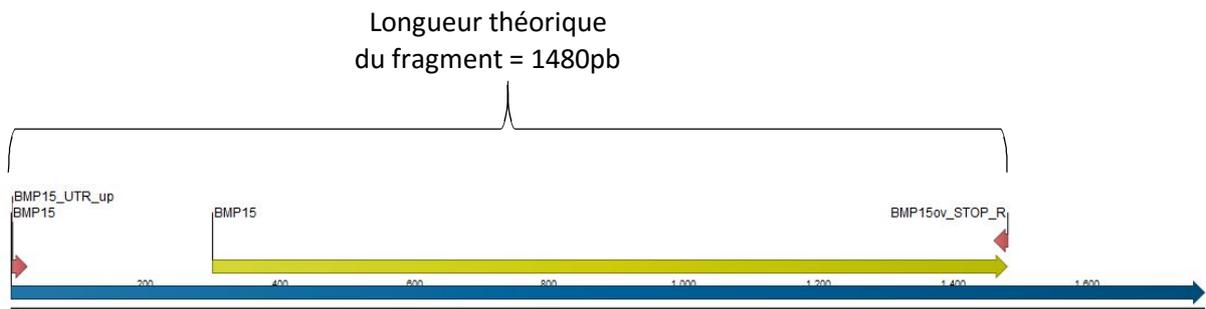


Figure 29: Positionnement des amorces PCR aux extrémités de l'ADNc de BMP15 déduit sous IGV par rapport à l'ADNc connue (en jaune).

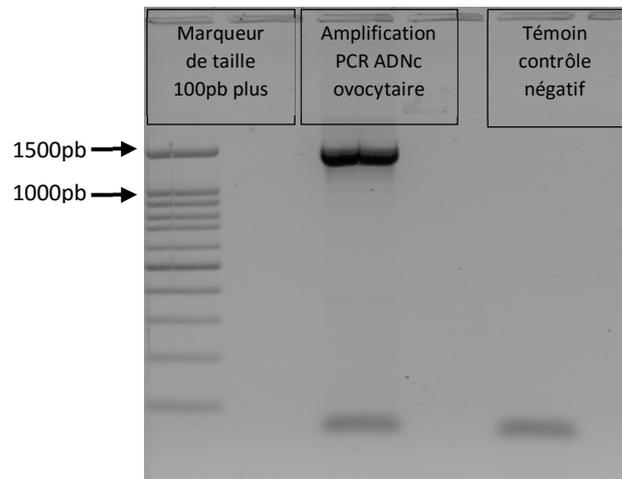


Figure 30: Résultat de l'amplification PCR sur gel d'agarose. Obtention d'un fragment légèrement inférieur à 1500 paires de bases sur de l'ADNc ovocytaire.

8. Fonction de la mutation *FecX^N*

Par l'approche de qPCR, j'ai pu montrer que l'allèle prolifique N était potentiellement la cause d'une baisse d'expression de *BMP15*. Mais il reste à déterminer comment. Comme on le voit dans la Figure 27 l'annotation du gène *BMP15* sur le génome ovin ne commence qu'au codon ATG initiateur de la traduction en protéine et la mutation N se trouve à 290 nucléotides en amont. Mais, tous les gènes ont un ARNm qui est transcrit à partir d'un site d'initiation de la transcription (site +1) qui est toujours situé en amont de l'ATG. La région entre le site +1 et l'ATG s'appelle la partie 5'UTR (Untranslated Region).

Dans un premier temps, il s'agit de confirmer ou non le positionnement de la mutation dans la partie 5'UTR de l'ARN de *BMP15*. Pour répondre à cette question, nous nous sommes servis de données du laboratoire de séquençages à haut-débit d'ARN d'ovocytes de brebis (Bonnet et al., 2013). Mon maitre de stage a réalisé une analyse bioinformatique de ces données pour aligner les lectures des ARN de *BMP15* sur le génome ovins (Figure 28). La figure montre quelques lectures de séquençage qui englobent la position de la mutation. La mutation *FecX^N* pourrait donc se situer dans la partie 5'UTR de l'ARN de *BMP15*. Pour en avoir confirmation, j'ai fait une transcription inverse à partir d'ARN ovocytaires afin d'obtenir un ADNc pleine longueur de *BMP15*. Grâce aux données de séquençage, des amorces ont été créées afin de s'hybrider à chaque extrémité de l'ADNc le plus en amont possible (site +1 potentiel) et jusqu'au codon STOP de la traduction (*BMP15_UTR_up* et *BMP15ov_STOP_R*, cf. Annexe 1) donnant en théorie un fragment de 1480 pb. Dans la Figure 29, en jaune est représentée l'annotation connue de la partie traduite à partir des exons 1 et 2 du gène *BMP15*. Après amplification PCR avec ces amorces et dépôt sur gel d'agarose (Figure 30), on obtient un fragment légèrement en dessous du marqueur 1500 pb qui valide l'existence d'un ADNc et donc d'un ARN *BMP15* avec une partie 5'UTR qui contient la position de la mutation *FecX^N*.

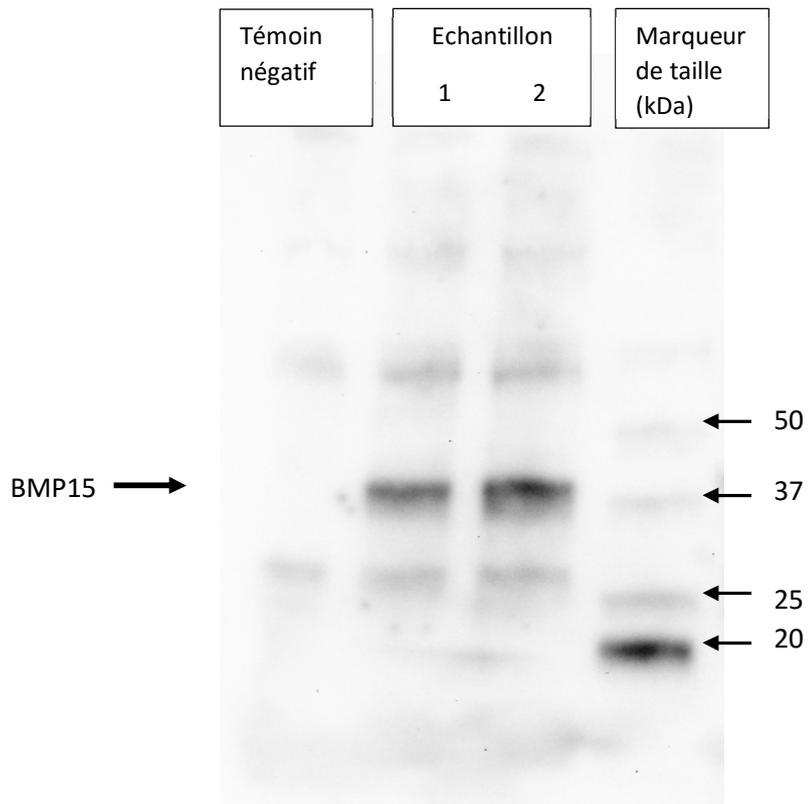


Figure 31: Résultat de transcription/traduction obtenu par Western-blot.

J'ai tenté le clonage des deux formes normales et mutantes de cet ADNc pleine longueur de *BMP15* dans le vecteur pGEM-T easy. Je n'ai réussi à obtenir que la forme « Sauvage » dans le cadre de ce stage. J'ai quand même effectué les essais de transcription et de traduction *in vitro* avec le kit TNT Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) afin de tester sa fonctionnalité. A la suite du Western-Blot (migration des protéines sur gel d'acrylamide et transfert sur membrane de nitrocellulose), j'ai détecté un signal protéique à la taille correspondante au poids moléculaire de la protéine BMP15 (45 kDa) (Figure 31).

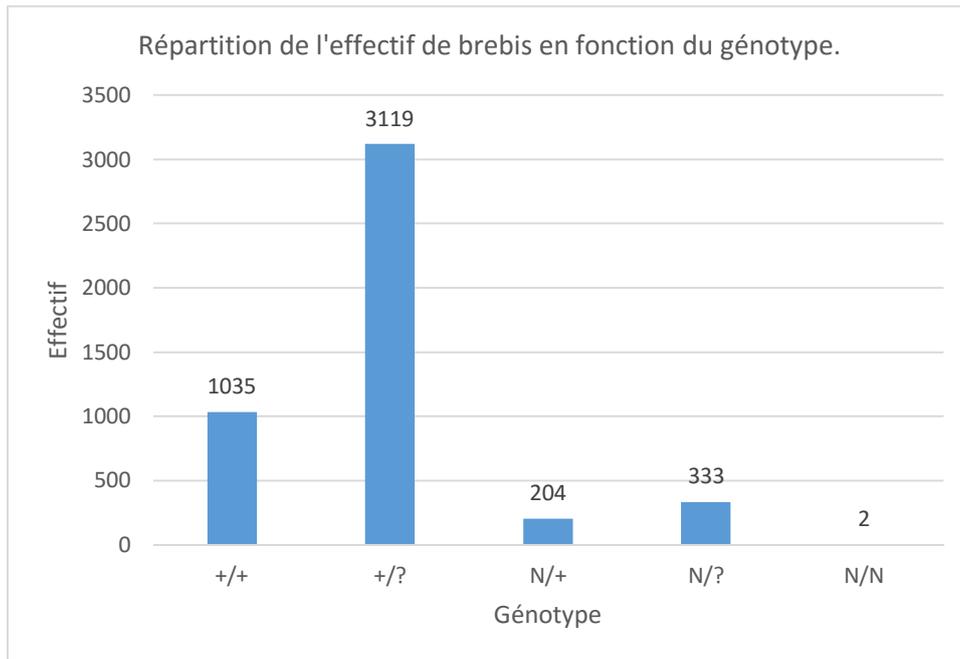


Figure 32: Répartition des nouveaux effectifs en fonction du génotype.

Tableau 9: Test d'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg sur 1241 femelles Noire du Velay au locus N.

Génotypes	Observé #	Attendu #
Homozygote reference:	1035	1041,7
Hétérozygote:	204	190,6
Homozygote variant:	2	8,7
^Put your values here^		
Freq allèle variant	0,08	

$X^2 = 6,164405$

X^2 test P value = **0,013035** avec 1 degré de liberté.

Si $P < 0.05$ - non conforme équilibre HW

VI. Discussion

Dans la race Noire du Velay existait une suspicion qu'un second gène majeur de prolificité ségrégait dans la population. Un nouveau SNP a été identifié, il s'agit du SNP OARX:50477717 situé près d'un gène candidat bien connu pour contrôler la prolificité, *BMP15*. Grâce au génotypage de 1151 femelle, j'ai déterminé que l'allèle variant N était présent à 7,2% dans la population de femelles génotypées et à hauteur de 14,5% chez les 76 mâles étudiés. *FecX^N* a pour effet d'augmenter très significativement la prolificité moyenne des brebis N/+ de 0,23 agneau et de 0,49 pour des brebis N/N par rapport à une moyenne de 1,53 chez les non porteuses.

La mutation affecte négativement l'expression du gène *BMP15* comme nous avons pu le voir avec les résultats de qPCR. En effet, chez des brebis homozygotes mutées, l'expression de *BMP15* est diminuée significativement par deux dans les ovocytes. La mutation *FecL* ségrége également dans cette race à hauteur de 10%.

Les analyses de fréquence de N sont basées sur un nombre d'animaux définis par rapport aux échantillons disponibles collectés sur plusieurs millésimes (1151) mais on ne sait pas si cela est assez représentatif de la population qui avoisine les 6000 brebis agnelant chaque année. Pour cela, il a été possible de déduire des génotypes sur généalogie. Ainsi, 4693 informations de génotypage (complets ou partiels) sont finalement disponibles à partir des 1151 femelles génotypées par RFLP. L'information *FecX^N* est complète pour 1241 femelles. Les nouveaux effectifs sont représentés dans la Figure 32. La fréquence des hétérozygotes change légèrement passant ainsi de 14,2% à 16,6% dans la nouvelle population échantillonnée. Lorsque l'équilibre d'Hardy-Weinberg est recalculé, le résultat du test de Chi² (Tableau 9) devient alors significatif (p-value= 0,013) avec un manque de femelles N/N observé (j'avais observé une tendance avec les 1151 génotypes). On pourrait supposer une pression de sélection négative sur les femelles N/N qui seraient éliminées rapidement. C'est l'hypothèse retenue dans le cas des mutations connues de *BMP15* qui donnent de la stérilité à l'état homozygote. Mais ce n'est pas le cas de *FecX^N*. Alors, c'est peut-être un choix volontaire des éleveurs de ne pas croiser leurs femelles prolifiques (supposées N/+) avec des mâles connus pour leur bon index de prolificité (supposés N/Y) pour ne pas avoir à gérer l'hyperprolificité des brebis N/N.

Un autre moyen d'obtenir une fréquence de l'allèle N à une génération donnée serait de génotyper une cohorte complète d'agnelles de renouvellement une année donnée (soit environ 1000 agnelles). Nous envisagerons certainement de le faire après discussion avec l'organisme de sélection Noire du Velay. Au cours de mon stage j'ai participé pour une autre race, la Vendéenne, à des prélèvements de sang sur une cohorte d'agnelles de renouvellement pour le génotypage d'une autre mutation prolifique de BMP15, *FecX^{Gr}* en Février 2016. J'ai obtenu le résultat de 1200 génotypages sur 1246 prélèvements pour une fréquence de l'allèle de 5,3%. Mais il faudra attendre les premiers résultats de mise bas de ces agnelles avant d'avoir un effet de la mutation.

Dans la population Noire du Velay, les fréquences des allèles L et N sont élevées dans la population analysée, respectivement 10 et 7%. Sur les 919 femelles utilisées afin de définir l'effet, au final 31% sont porteuses d'un allèle prolifique N et/ou L, ce qui expliquerait en grande partie la prolificité élevée de cette race. Une sélection classique polygénique n'est certainement plus adaptée compte tenu de la présence de deux gènes majeurs de prolificité présents dans la race Noire du Velay. Au regard de ces résultats, l'organisme de sélection devra certainement prendre des décisions de gestion de ces mutations. La question de garder en ségrégation les deux mutations peut se poser. Cependant, l'éradication de l'une ou l'autre mutation semble difficile vu leur fréquence élevée avec un risque de perdre des animaux améliorateurs pour d'autres critères de production. Il faudra certainement envisager une gestion des deux. La mise en place d'un génotypage systématique des mâles reproducteurs et des agnelles sera à mettre en place avec *FecX^N* comme c'est déjà fait avec *FecL^L*.

La mutation *FecL^L* a été trouvée à hauteur 30% dans la population Lacaune (Martin et al., 2014) et 19% d'animaux Noire du Velay sont porteurs de cette mutation. Il pourra être intéressant de voir quels liens il peut exister entre ces deux populations qui partagent la même mutation en utilisant une analyse phylogénétique. De la même façon, comment la mutation *FecX^N* présente en Noire du Velay, ségrége également en Belle-Ile et en Blanche du Massif Central. Cependant, les données de mise-bas disponibles pour la race Belle-Ile sont largement incomplètes. Il n'y a pas d'organisme de sélection qui gère les données de performance pour cette race et de plus, j'ai génotypé la quasi-totalité de la population de cette race à très petits effectifs.

En ce qui la Blanche du Massif Central, il faudra certainement génotyper une cohorte d'agnelles de renouvellement pour avoir une fréquence est un effet précis de la mutation N.

Avec la déduction du génotype des animaux Noire du Velay, j'ai pu estimer les effets de la mutation *FecX^N* sur la prolificité, soit par une approche statistique simple ANOVA pour estimer uniquement l'effet du génotype, soit par une approche mixte GLM permettant de prendre en compte une multitude de paramètres d'élevage en plus du génotype. Par les deux méthodes, je trouve des effets similaires de l'effet de N sur la prolificité, entre 0,19 (GLM) et 0,23 (ANOVA) agneaux supplémentaires, et de +0,4 (ANOVA et GLM) pour L. L'effet additif de L est conservé comme dans la population Lacaune mais ce dernier est légèrement diminué (effet +0.5 dans la population Lacaune (Martin et al., 2014)). La méthode GLM donne par contre des indications sur les effets interférants avec l'effet du génotype. Il s'agit de l'élevage, de la saison de lutte et l'âge à la mise bas. Par contre, l'année de naissance, le mode d'élevage et le mode de naissance sont toujours non significatif. Ainsi le modèle d'estimation de la prolificité chez les brebis Noire du Velay pourrait être simplifié ainsi : $TP = Elv * An * Sai + Age + FecL * FecX + Anim + \epsilon$ pour une évaluation future.

Finalement les résultats obtenus sont à destination des éleveurs et de l'organisme de sélection Noire du Velay. La gestion des gènes *FecX^N* et *FecL* dans cette population doit être mise en place comme cela a pu être le cas pour la race Lacaune avec Ovi-test. Afin d'aider la prise de décision, une thèse est menée par Jérôme Raoul qui vise à construire des modèles de prédiction.

L'étude des données génétiques associée à l'allèle N a montré une bonne corrélation avec l'augmentation de la prolificité. Le SNP est proche du gène *BMP15* déjà connu pour être responsable du contrôle de la taille des portées chez les ovins (Fabre et al., 2006). Les autres mutations portées par ce gène comme *FecX^L*, ou *FecX^{Gr}* ont un effet négatif sur la protéine soit en diminuant sa quantité soit sa qualité (Bodin et al., 2007; Demars et al., 2013). Cependant, la mutation *FecX^N* est en amont de l'ATG initiateur de la traduction en protéine, donc ne peut pas affecter celle-ci. Par contre, j'ai pu montrer que la mutation était associée à une baisse d'expression des ARNm du gène *BMP15* dans les ovocytes des brebis porteuses de la mutation. Si les ARN sont diminués, alors la traduction en protéine devraient aussi être diminuée.

On peut donc rapprocher nos résultats de ceux de la littérature qui indiquent une perte de fonction de *BMP15* associée à une augmentation de la proliféricité (Fabre et al., 2006). Le nombre d'animaux expérimentaux qui a permis d'identifier la baisse d'expression de *BMP15* dans les ovocytes a été très limité. Afin d'assurer le résultat confirmant l'hypothèse, le test de qPCR doit être refait sur un plus grand nombre d'animaux et compléter par un test de détection et quantification de la protéine (western blot par exemple).

Il reste à déterminer par quelle voie biologique l'expression de ce gène ovocytaire *BMP15* diminue. Deux hypothèses ont été envisagées. La première étant que la mutation soit présente dans la partie 5'UTR du gène et ayant un impact négatif sur la transcription ou la traductibilité des ARN. Par RT-PCR, j'ai pu indiquer la possible appartenance de la position de la mutation *FecX^N* au 5'UTR du gène *BMP15*, ce qui n'était pas indiquée dans l'annotation fonctionnelle du gène dans les bases de données génomiques. Cependant, l'amorce 5' utilisée pour s'hybrider à l'ADNc contient la mutation et 7 paires de bases en amont. Il reste possible d'avoir eu une « queue » libre avec une hybridation partielle sur les 15 paires de bases après la mutation faussant la position du site +1 de quelques bases. La technique de RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA-Ends), permettrait de définir le site +1 à la base près. De façon à valider l'hypothèse d'un effet de N sur la transcription/traduction, j'ai engagé un clonage des cDNA normaux et mutés de *BMP15* dans le vecteur pGEM-T (Promega). A ce jour, je n'ai obtenu que la construction normale. Mais, lorsque la construction mutée sera disponible, l'hypothèse sera testée à l'aide d'un kit de transcription/traduction *in vitro* que j'ai validé et on pourra visualiser s'il existe une différence sur la quantité d'ARN et de protéine produite par cette technique entre la forme sauvage et la forme mutée.

La seconde hypothèse est qu'il n'y a pas d'impact sur la transcriptionnabilité ou la traductibilité mais sur la régulation même de l'activité promotrice. Plusieurs éléments régulateurs de l'activité promotrice sont connus dans *BMP15* porcin (Wan, Wang, & Wang, 2015) mais aucun à la position de la mutation *FecX^N*. Pour visualiser l'activité promotrice d'un gène d'intérêt on peut utiliser une approche *in vitro* de gène rapporteur du type Luciférase. Ainsi, j'ai commencé des clonages dans le vecteur pGL (Promega) de différentes parties de la région promotrice du gène *BMP15* ovin avec ou sans la mutation *FecX^N*. Ces régions vont contrôler l'expression du gène de la Luciférase.

Après transfert dans des cellules eucaryotes en culture, on pourra mesurer la luminescence émise par les extraits cellulaires en fonction de la quantité de Luciférase produite sous le contrôle de la mutation *FecX^N* par comparaison de la forme sauvage *FecX⁺*. Les résultats de ces différentes approches de biologie moléculaire devraient nous permettre de conclure quant à la bonne hypothèse.

VII. Conclusion

Les objectifs de ce mémoire étaient d'une part d'avoir une première approche de l'étude génétique du nouveau polymorphisme OARX: 50477717 A>T associé à la prolificité ovine en amont du gène *BMP15*, et d'autre part de caractériser les conséquences biologiques de la mutation *FecX^N* qui en découlent. Pour répondre à ces objectifs, j'ai dû associer différentes approches génétiques et biologiques.

D'un point de vue purement génétique, la mise en place d'un génotypage efficace, fiable et peu coûteux (environ 20 centimes/animal) par la technique de RFLP a permis de génotyper un grand nombre d'animaux Noire du Velay. Grâce à cela, j'ai pu déterminer la fréquence de la mutation *FecX^N* dans cette population et en déterminer les effets. La présence de la mutation est très fortement corrélée avec une augmentation des mises-bas multiples. Les résultats s'appuient sur les mises-bas enregistrées grâce aux données ovins allaitants (OVALL) et sur des analyses statistiques simple (ANOVA) ou plus complexe (GLM). Mes résultats sont assez avancés pour en discuter avec les éleveurs et l'organisme de sélection de la race afin d'envisager la diffusion de l'information et la gestion de ce gène de prolificité.

D'un point de vue biologique, j'ai pu déterminer que la présence de la mutation entraîne une perte d'expression de *BMP15* ce qui est en adéquation avec la littérature déjà publiée sur ce gène. J'ai également fourni des arguments pour penser que la mutation est présente dans la partie 5'UTR du gène et que par conséquent l'ARNm de *BMP15* est plus « grand » que ce qui est pour le moment défini. Il reste à déterminer les voies de régulation de l'expression de ce gène ovocytaire par des techniques *in vitro* de clonage et de transcription/traduction. Je pourrais mener et finaliser ces travaux au cours d'une thèse que je compte réaliser au sein de l'équipe GenROC dans laquelle j'ai effectué ce stage.

De façon plus personnelle, au cours des 6 derniers mois j'ai appris énormément sur ce qu'est la recherche en laboratoire scientifique et le lien avec le terrain. Ce stage de fin d'étude m'a permis de conforter également mon projet professionnel alliant recherche, production animale, reproduction et génétique.

J'ai également été confronté à des difficultés sur les expériences réalisées surtout au niveau du clonage. Il faut alors s'adapter aux conditions expérimentales et persévérer. Je suis reconnaissante d'avoir pu effectuer ce stage et d'avoir pu suivre une formation aussi passionnante.

Bibliographie

- Agreste. (2015). GraphAgri France; Produits agroalimentaire : Productions animaux. Consulté à l'adresse <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Gaf15p145-163.pdf>
- 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*(1), 393-400.
- Bonnet, A., Cabau, C., Bouchez, O., Sarry, J., Marsaud, N., Foissac, S., 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.
- Cuppen, E., Gort, E., Hazendonk, E., Mudde, J., van de Belt, J., Nijman, I. J., Plasterk, R. H. A. (2007). Efficient target-selected mutagenesis in *Caenorhabditis elegans*: Toward a knockout for every gene. *Genome Research*, *17*(5), 649-658.
- 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*(4), 525-529.
- Demars, J., Fabre, S., Sarry, J., Rossetti, R., Gilbert, H., Persani, L., Bodin, L. (2013). Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genetics*, *9*(4), e1003482.
- Drouilhet, L., Gilbert, H., Balmisse, E., Ruesche, J., Tircazes, A., Larzul, C., & Garreau, H. (2013). Genetic parameters for two selection criteria for feed efficiency in rabbits. *Journal of Animal Science*, *91*(7), 3121-3128.
- 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*(6), 804-812.
- Fabre, S., Pierre, A., Mulsant, P., Bodin, L., Di Pasquale, E., Persani, L., Monniaux, D. (2006). Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *4*, 20.
- Guerrier, J., Praud, J. P., Poivey, J., Batut, H., Grenet, G., & Boux, J. (2010). Définition économique des objectifs de sélection en ovins allaitants. Application à la race Blanche du Massif Central (p. 443-446). Présenté à 17èmes Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, France.

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*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900-909.

Hinch, G. N., Kelly, R. W., Davis, G. H., Owens, J. L., & Crosbie, S. F. (1985). Factors affecting lamb birth weights from high fecundity Booroola ewes. *Animal Reproduction Science*, 8(1), 53-60.

INTERBEV. (2015). L'essentiel de la filière viande ovine française 2015.

Martin, P., Raoul, J., & Bodin, L. (2014). Effects of the *FecL* major gene in the Lacaune meat sheep population. *Genetics, Selection, Evolution: GSE*, 46, 48.

Monniaux, D., Caraty, A., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., ... Uzbekova, S. (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. Consulté 8 juin 2016, à l'adresse <http://www6.inra.fr/productions-animales/2009-Volume-22/Numero-2-2009/Developpement-folliculaire-ovarien-et-ovulation-chez-les-mammiferes>

Mulsant, P., Lecerf, F., Fabre, S., Schibler, L., Monget, P., Lanneluc, I., ... Elsen, J. M. (2001). Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(9), 5104-5109.

Origine et standard de la Noire du Velay - Races ovines des massifs. (2016, avril 11). Consulté 11 avril 2016, à l'adresse <http://www.races-ovines-des-massifs.com/fr/description-races/noire-velay/origine-standard.php>

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 (*BMPR1B*) gene. *The Journal of Endocrinology*, 169(2), R1-6.

Tiphine, L., & IDELE. (2015). Bilan du Contrôle de Performances ovins allaitants 2015. Consulté 11 juillet 2016, à l'adresse : http://idele.fr/no_cache/recherche/publication/idelesolr/recommends/bilan-du-contrôle-de-performances-ovins-allaitants-annee-2015.html

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(10), 25759-25772.

Wilson, T., Wu, X. Y., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A., ... 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. *Biology of Reproduction*, 64(4), 1225-1235.

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées et leur séquence

Amorce	Séquence	Mutation / gène	Utilisation
SNP50977717_BMP15_R	TGGAAGTAGGGTGGGAACAG	<i>FecX</i>	PCR
SNP50977717_BMP15_F	CACAAAGGATAGGGCAAGGA	<i>FecX</i>	PCR
B15_732	GGCACTTCATCATTGGACACT	<i>FecX</i>	PCR/réaction séquençage
BMP15_997	TTGCTCCCCATCTCTATACCC	<i>FecX</i>	PCR
B15_1205	GGCAATCATAACCCTCATACTCC	<i>FecX</i>	PCR
BMP15_UTR_up	CCTTTTAAATACGATCTTGTTC	<i>FecX</i>	PCR
BMP15_UTR_up_mut	CCTTTTATATACGATCTTGTTC	<i>FecX</i>	PCR
BMP15_STOP_R	GTCACCTGCATGTGCAGGACTG	<i>FecX</i>	PCR
58 13540_upT	GCAAGAAGCTGCGTGTGT	<i>FecL</i>	KASPAR
5813540_upA	GCAAGAAGCTGCGTGTGA	<i>FecL</i>	KASPAR
5813540_dnbis	TATGCATGGCATGTGATAGG	<i>FecL</i>	KASPAR
B151-112	TTCTTGCCCTATCCTTTGTG	Séquençage <i>BMP15_ Exon1</i>	PCR/réaction séquençage
B151-597	ACTTTTCTTCCCCATTTTCTCCC	Séquençage <i>BMP15_ Exon1</i>	PCR/réaction séquençage
B15-359	CGCTTTGCTCTTGTTCCTC	Séquençage <i>BMP15_ Exon2</i>	PCR/réaction séquençage
G9E1-1734	GAAGACTGGTATGGGGAAATG	Séquençage <i>GDF9_ Exon1</i>	PCR/réaction séquençage
G9E1-2175	CCAATCTGCTCCTACACACCT	Séquençage <i>GDF9_ Exon1</i>	PCR/réaction séquençage
G9-3270	TGGCATTACTGTTGGATTGTTTT	Séquençage <i>GDF9_ Exon2</i>	PCR/réaction séquençage
G9-4376	GCTCCTCCTTACACAACACACAG	Séquençage <i>GDF9_ Exon2</i>	PCR/réaction séquençage
G9-3707	TGAACGACACAAGTGCTCAGG	Séquençage <i>GDF9_ Exon2</i>	réaction de séquençage
bBMP15-S2	GTCAAGCAGGCAGTATTG	<i>FecX</i>	qPCR
bBMP15-AS2	AGAATTGAGACCATAGTGTAGTA	<i>FecX</i>	qPCR
GDF9-up	TAGTCAGCTGAAGTGGGACA	<i>GDF9</i>	qPCR
GDF9-dn	AGCCATCAGGCTCGATGGCC	<i>GDF9</i>	qPCR
RPL19_up	AATGCCAATGCCAACTC	<i>RPL19</i>	PCR ADNc / qPCR
RPL19_dn	CCCTTTCGCTACCTATACC	<i>RPL19</i>	PCR ADNc/ qPCR

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Pondération économiques et écart type génétique des caractères d'intérêt en élevage ovin.....</i>	<i>2</i>
<i>Tableau 2: Récapitulatif des gènes majeurs de prolificité connus ou suspectés en ovins.....</i>	<i>2</i>
<i>Tableau 3: Test d'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg sur 1151 femelles Noire du Velay au locus N.....</i>	<i>20</i>
<i>Tableau 4: Test d'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg sur 1148 femelles Noire du Velay au locus L.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 5: Répartition des mises bas en fonction du génotype de 919 femelles Noire du Velay.....</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 6: Effet de la mutation $FecX^N$ sur la taille de portée pour 756 femelles Noire du Velay $FecL^+$ avec un modèle GLM.</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 7: Effet de la mutation $FecL$ sur la taille de portée pour 780 femelles Noire du Velay $FecX^+$ avec un modèle GLM.</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 8: Données phénotypiques et généalogiques de brebis très prolifique mais sauvage aux deux loci $FecX^N$ et $FecL^L$.</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 9: Test d'équilibre de la loi d'Hardy-Weinberg sur 1241 femelles Noire du Velay au locus N.....</i>	<i>28</i>

Liste des figures

Figure 1: Répartition du cheptel ovin français.	1
Figure 2: Répartition géographique des élevages ovins en fonction de leur taille en France.	1
Figure 3: Répartition des mutations de prolificité sur le gène BMP15.	3
Figure 4: Répartition des mutations de prolificité sur le gène GDF9.	3
Figure 5: Conséquence des mutations des gènes de prolificité sur la folliculogénèse et le nombre d'ovulations chez la brebis.	3
Figure 6: Répartition du nombre de brebis Noire du Velay par département.	5
Figure 7: Brebis standard de race Noire du Velay.	5
Figure 8: Valeur du test Chi2 pour chaque SNP positionné le long du génome ovin (version 3.1).	6
Figure 9: Valeurs de test Chi2 des SNP du chromosome X, un signal significatif à proximité des coordonnées du gène candidat BMP15.	6
Figure 10: Résultats de séquençage haut débit de 3 brebis Noire du Velay. Les deux brebis prolifiques ont un SNP T>A, coordonnées génomiques OARX : 50477717 en amont du gène BMP15 OARX : 50970938-50977454.	7
Figure 11: Positionnement des amorces PCR sur le gène BMP15 afin d'étudier le polymorphisme FecX ^N	10
Figure 12: Principe du génotypage KASPar allèle spécifique.	11
Figure 13: Ovocytes de brebis au milieu de cellules folliculaires de la granulosa (objectif x10).	12
Figure 14: Ovocyte entouré par une couronne de cellules de granulosa (objectif x20).	12
Figure 15: Ovocyte intègre et dénudé (objectif x20).	12
Figure 16: Principe de fonctionnement du kit d'extraction d'ARN.	13
Figure 17: Programme utilisé par le thermocycleur lors des PCR quantitative en temps réel.	14
Figure 18: Exemple de courbe obtenue comme résultat d'une PCR quantitative en temps réel.	15
Figure 19: Représentation circulaire du vecteur pGEM-T Easy et site multiple de clonage.	16
Figure 20: Site de coupure théorique par l'enzyme MseI lié à l'absence de la mutation FecX ^N	19
Figure 21: Résultat sur gel d'agarose de la digestion par l'enzyme MseI après PCR sur les 3 brebis témoins pour la mutation FecX ^N	20
Figure 22: Histogramme des moyennes non corrigées de taille de portée et leurs écart type en fonction du génotype aux loci N et L.	21
Figure 23: Effet de la mutation FecX ^N sur la taille des portées dans les populations Blanche du Massif Central et Belle-Ile (moyenne ± Ecart-type).	23
Figure 24: Courbes d'efficacités des couples d'amorces pour les 3 gènes utilisés en qPCR.	24
Figure 25: Résultat de la PCR quantitative en temps réel sur l'expression relative de BMP15 en pourcentage de RPL19 dans des ovocytes en fonction du génotype au locus N.	25
Figure 26: Résultat de la PCR quantitative en temps réel sur l'expression relative de GDF9 en pourcentage de RPL19 dans des ovocytes en fonction du génotype au locus N.	25
Figure 27: Annotation sur le brin complémentaire du gène BMP15 sous le logiciel IGV avec la version 3.1 du génome ovin.	26
Figure 28: Alignement de lectures ARN de BMP15 sur le génome ovin et positionnement de la mutation FecX ^N sous le logiciel IGV avec la version 3.1 du génome ovin.	26
Figure 29: Positionnement des amorces PCR aux extrémités de l'ADNc de BMP15 déduit sous IGV par rapport à l'ADNc connue (en jaune).	26
Figure 30: Résultat de l'amplification PCR sur gel d'agarose. Obtention d'un fragment légèrement inférieur à 1500 paires de bases sur de l'ADNc ovocytaire.	26
Figure 31: Résultat de transcription/traduction obtenu par Western-blot.	27
Figure 32: Répartition des nouveaux effectifs en fonction du génotype.	28

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BMP : Bone Morphogenetic Protein

BMP15: Bone morphogenetic protein 15

BMPR1B: Bone morphogenetic protein receptor type 1B

Ct: "Threshold cycle" ou cycle seuil

dNTP: Nucléoside triphosphate

E2: œstradiol

Fec: Fecundity gene

FecB : gène de fécondité Booroola, *BMPR1B*

FecG : gène de fécondité *GDF9*

FecL : gène de fécondité Lacaune, chromosome 11

FecX : gène de fécondité *BMP15*

FecX^N : gène de fécondité *BMP15* allèle Noire du Velay

FSH : Folliculostimulating Hormone

GDF9 : Growth differentiation factor 9

INH : inhibine

kDa : kilo Dalton

LH : Luteinizing Hormone

NdV : Noire du Velay

pb : paire de base

PCR : Polymerase chain reaction

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RPL19: Ribosomal Protein L19

SNP : Single nucleotide polymorphism

Résumé

Les objectifs de ce mémoire étaient de calculer la fréquence et les effets d'un nouveau polymorphisme SNP A>T OARX: 50477717 en amont du gène *BMP15* dans la race ovine Noire du Velay appelée *FecX^N*. Mais également de déterminer la causalité de *FecX^N* qui est fortement corrélée avec des prolificités élevées chez les brebis. Grâce au développement d'un génotypage par RFLP, la fréquence allélique de *FecX^N* a été déterminé à 7%. Puis par analyse statistique, ANOVA et GLM, les effets de la mutation ont été prédit engendrant une augmentation de la taille de portée de 0,23 agneau. La mutation a été trouvé dans d'autres races, la Blanche du Massif Central et la Belle-Ile avec des fréquences alléliques chez les femelles de 2,3% et 3,2% respectivement. De plus, la mutation *FecL^L* ségrége dans la population chez les Noire du Velay à hauteur de 10% et engendre +0,4 agneau. Le SNP est situé avant l'ATG, partie non codante du gène, mais qui fait partie du 5'UTR de *BMP15* d'après les résultats de PCR sur l'ADNc ovocytaire pleine longueur, à la différence des autres mutations à effet majeur de prolificité dans *BMP15* en position exonique. Nous avons établi par qPCR que cette mutation induit une perte d'expression de *BMP15*. Il reste à déterminer par quelle voie biologique l'expression diminue. Deux hypothèses, un impact négatif sur la transcription ou la traduction ou bien, sur la régulation de l'activité promotrice.

Mots clés : BMP15, prolificité, gène majeur, Noire du Velay, mutation causale.

Abstract

The aims of this report were to calculate the frequency and the effects of a new polymorphism SNP A>T OARX: 50477717 in advance of *BMP15* gene in an ovine breed Noire du Velay called *FecX^N*. But also to determine the causality of *FecX^N* which is strongly correlated to high prolificacy in ewes. Thanks to the development of a genotyping by RFLP, the allele frequency was determined to 7%. Then by statistical analysis, ANOVA and GLM, the effects of the mutation were predicted engendering an increase of the litter size up to 0.23 lamb. The mutation was also found in other breeds as Blanche du Massif Central and Belle-Ile with allele frequencies for the females equal to 2.3% and 3.2% respectively. Furthermore, the mutation *FecL^L*, was found in Noire du Velay population at the level of 10% and engenders +0.4 lamb. The SNP is situated before the ATG, in a non coding region of the gene, but which is a part of the 5'UTR of *BMP15* according to the PCR on an ovocytary cDNA full length, unlike the other mutations with major effects on prolificacy in *BMP15* in exon position. We established by qPCR that mutation leads to a loss of expression of *BMP15*. It remains to determine by which biological way the expression decreases. Two hypotheses, a negative impact in the transcription or the translation or, on the regulation of the promoter activity.

Keywords : BMP15, prolificacy, major gene, Noire du Velay, causal mutation.