CONTRÔLE GÉNÉTIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE LA PROLIFICITÉ EN RACE OVINE LACAUNE : IDENTIFICATION ET RÔLE FONCTIONNEL DU GÈNE *FECL*[1]

par Camille **Mansanet**

De nos jours, les élevages ovins allaitants constituent une activité économique nationale de premier plan. Fragilisée par la conjoncture actuelle liée aux prix des aliments, les controverses sur la consommation de viande ou encore l'érosion des effectifs ovins, la profession s'est investie depuis quelques années dans le développement d'une action nationale de «Reconquête Ovine» dont les enjeux sont d'orienter les élevages vers des systèmes de production durables, alliant performance, rentabilité et respect de l'environnement.

Parmi les composantes pouvant influencer la performance, la productivité numérique apparaît évidente. Elle dépend en grande partie de la prolificité des brebis, à savoir le nombre d'agneaux nés par brebis et par mise bas. Ce critère zootechnique s'avère être très variable entre races ovines, avec l'existence de races de brebis dites prolifiques (portée de trois agneaux), et d'autres peu prolifiques (portée proche d'un agneau). Avec cette variabilité, l'objectif de la filière allaitante est de produire un optimum de 2 agneaux par portée et par brebis afin de garantir la rentabilité économique de l'élevage, tout en ayant recourt, dans un souci de respect de l'environnement, à des biotechnologies de la reproduction alternatives aux traitements hormonaux. Dans ce contexte, l'amélioration génétique de la prolificité afin de maintenir des animaux plus performants au sein des troupeaux apparait comme un outil profitable permettant d'alimenter ce système durable.

La prolificité est considérée comme un caractère difficile à sélectionner puisqu'il s'agit d'un caractère peu héritable et polygénique, à savoir sous l'influence plus ou moins prononcée de plusieurs gènes ainsi que de facteurs environnementaux (Ricordeau et al., 1990; Maijala et Österberg, 1977). Le gain issu de cette sélection génétique est par conséquent lent. Néanmoins, chez certaines races non prolifiques, l'observation de brebis avec des prolificités élevées a permis de mettre en lumière l'existence d'un déterminisme de type monogénique, pour lequel un seul gène, appelé gène à effet majeur ou encore gène de fécondité (*Fec*), contribue à lui seul à expliquer la variabilité de la taille de la portée (Fabre et al., 2006 ; Vinet et al., 2012). L'identification des gènes *Fec* et des mutations associées affectant la prolificité est particulièrement intéressante :

- d'une part, ils deviennent des marqueurs génétiques permettant une sélection génétique contrôlée et rapide. Avec la connaissance de la mutation et de son effet, il devient aisé de maîtriser la diffusion du gène d'intérêt dans les populations sélectionnées sur leur prolificité et de maintenir une production d'agneaux proche de l'optimum.
- d'autre part, comme la prolificité est en partie dépendante du nombre d'ovulations, les brebis porteuses de mutations dans les gènes *Fec* deviennent des modèles de prédilection dans la compréhension de la fonction ovarienne et des pathologies associées.

[1] Soutenue le 10 décembre 2013 pour obtenir le grade de : Docteur de l'université François - Rabelais de Tours, dans le cadre de Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (Centre-Val de Loire) , en partenariat avec SST/12/UMR CNRS INRA 7247 - PRC - Physiologie de la Reproduction et des Comportements (équipe de recherche).

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

Parmi ces races ovines peu prolifiques présentant cette particularité, on retrouve la race Lacaune. Avec un effectif de 1,2 millions de brebis, la race Lacaune est la principale race en France puisqu'elle représente environ 20% du cheptel français. Elle comporte aussi bien des lignées dédiées à la production laitière (filière « lait » destinée à la fabrication du fromage de Roquefort) qu'à l'élevage d'agneaux sous la mère (filière « viande »). C'est au sein de la filière viande, qui fait l'objet de ce travail, qu'est observée une grande variabilité de la prolificité, avec la présence de brebis non prolifiques, présentant un fonctionnement ovarien normal (normo-ovulantes, 1-2 ovulations par cycle) et des brebis prolifiques (jusqu'à 8 agneaux par portée) présentant un fonctionnement ovarien modifié conduisant à de multiples ovulations (hyper-ovulantes).

Afin d'identifier la cause génétique de cette variabilité phénotypique, de précédents travaux de thèse ont associé l'hyper-prolificité à des marqueurs génétiques situés sur le chromosome 11 ovin. Des études additionnelles ont permis d'affiner cette localisation à une région de 250Kb dans laquelle se trouvent 5 gènes annotés (Drouilhet et al., 2009). A partir de ces informations, il était nécessaire de poursuivre ce travail et de réduire davantage cette zone afin d'identifier le gène appelé *FecL* (gène de Fécondité en race Lacaune), la mutation causale $FecL^L$ responsable de ce phénotype prolifique, et de comprendre son effet sur le gène *FecL*. Dans un second temps, il était important de comprendre les conséquences physiologiques liées à la présence de cette mutation sur la fonction ovarienne et le contrôle du nombre d'ovulation.

Afin de réduire au maximum la zone de localisation de *FecL* de 250Kb et d'isoler la mutation causale, nous avons entrepris un séquençage moderne à haut débit (NGS Roche 454) de cette zone chez une brebis normo-ovulante +/+ et chez une brebis hyper-ovulante mutée L/L. Une étude comparative des séquences +/+ et L/L obtenues nous a *in fine* permis de réduire la zone où se trouve la mutation prolifique $FecL^L$ à 194,6Kb (Figure 1).

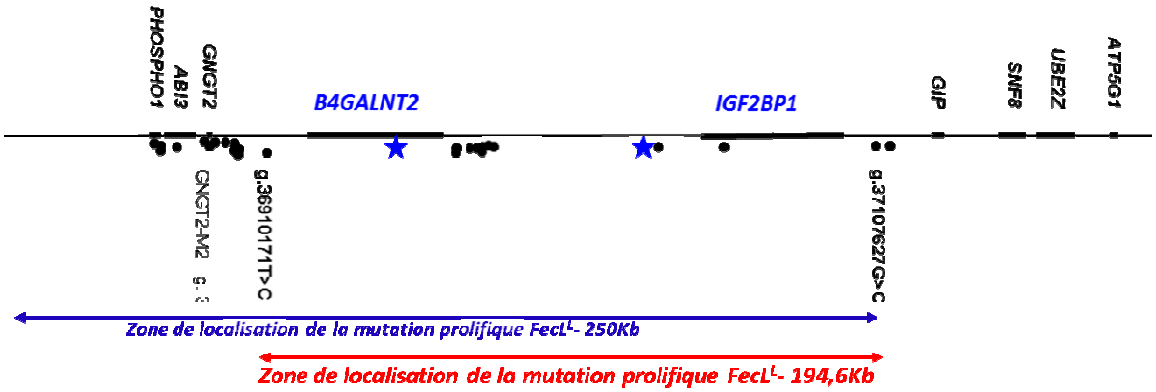

Figure 1. Carte du locus *FecL* sur le chromosome 11 ovin
Rectangles et ronds : gènes et marqueurs respectivement, étoiles : les deux mutations potentielles

Cette zone ne comprend plus que 2 gènes candidats positionnels, *IGF2BP1* et *B4GALNT2*, et deux mutations susceptibles d'être causales. Ces mutations ne touchent pas de séquences codant pour les protéines, elles n'affectent donc pas directement la nature des protéines codées par ces deux gènes. Néanmoins le mécanisme avec lequel elles affectent les gènes candidats reste encore incompris.

Puisque les approches de génétique ne nous ont pas permis d'isoler un des deux gènes comme étant le gène *FecL*, nous avons choisi de tirer partie de l'étude de leur expression pour parvenir à les discriminer. *IGF2BP1* (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1) code pour une protéine de liaison aux ARNm dont l'expression est ubiquiste, alors que *B4GALNT2* (beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2) code pour une enzyme de glycosylation qui transfère des sucres sur des glycoprotéines cibles et son expression est intestinale. Aucun de ces deux gènes, ni les protéines qu'ils codent, n'ont été montrés comme ayant un rôle important dans l'axe reproducteur hypothalamo-hypophyso-ovarien. Pourtant les analyses de l'expression de ces deux gènes au niveau des ARNm révèlent un effet de la mutation dans les ovaires des brebis mutées L/L. Cet effet se traduit par une surexpression des deux gènes dans les cellules ovariennes L/L,

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

de 6 fois pour *IGF2BP1*, de 1000 fois et de manière ectopique par rapport à son tissu d'origine pour *B4GALNT2* (Drouilhet et Mansanet, 2013) (Figure 2).

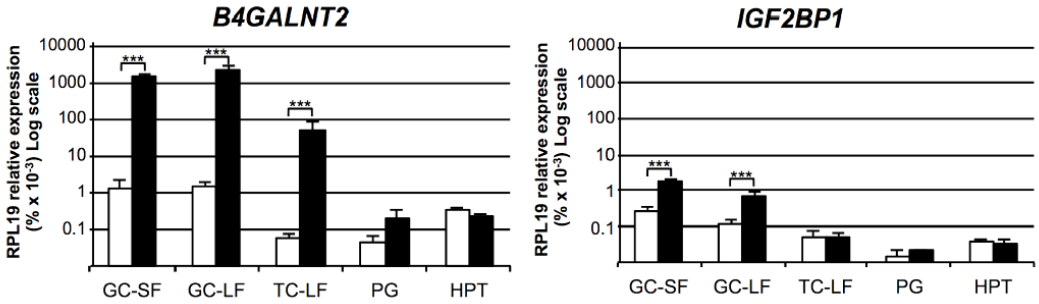

Figure 2. Analyse de l'expression des gènes situés dans le locus minimal de *FecL* par RT-PCR en temps réel
GC-SF et GC-LF : cellules ovariennes de granulosa, de petits (SF) et gros (LF) follicules, TC-LF : cellules ovariennes de la thèque de gros follicules, PG : hypophyse, HPT : hypothalamus

De manière intéressante, seule la forte surexpression des ARNm de *B4GALNT2* observée dans les ovaires L/L se répercute au niveau de la protéine comme le montrent les expériences d'immuno-histochimies (Figure 3). Nous avons donc émis l'hypothèse que *B4GALNT2* serait le meilleur candidat pour être le gène *FecL* en race ovine Lacaune.

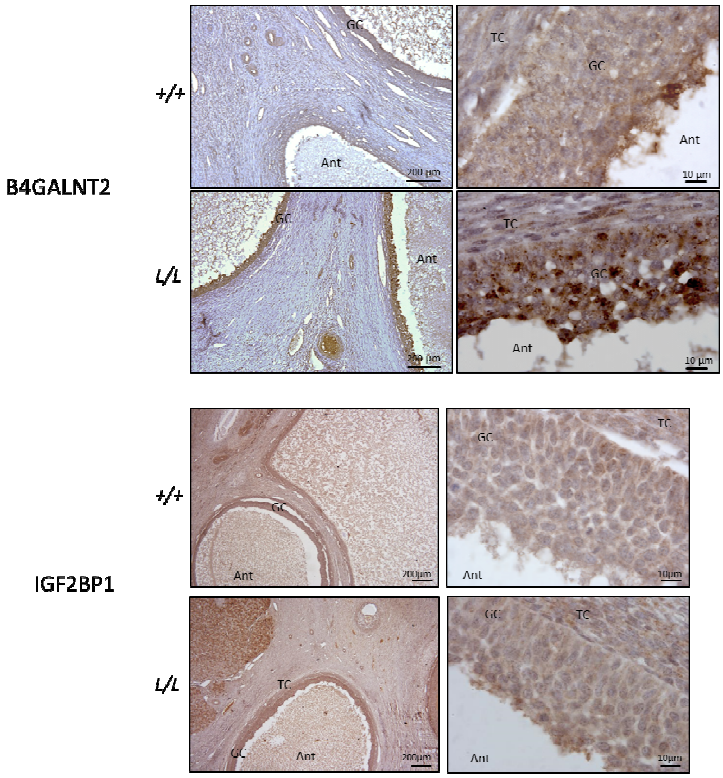

Figure 3. Immunomarquage d'IGF2BP1 et de B4GALNT2 dans les ovaires de brebis Lacaune +/+ et L/L
GC : cellules de granulosa, TC : cellules de la thèque, Ant : antrum.

Pour aller plus loin, nous nous sommes intéressés à l'activité de glycosylation de B4GALNT2. En utilisant une lectine reconnaissant spécifiquement les résidus sucrés transférés par cette enzyme (lectine DBA Dolichos Biflorus Agglutinin), il a été possible de mettre en évidence par lectine-histochimie (Figure 4) et Western blot (Figure 5), que son activité de glycosylation se retrouvait exclusivement dans les cellules

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

ovariennes *L/L* et que les cibles glycosylées par B4GALNT2 pouvaient être sécrétées dans les liquides folliculaires des ovaires de brebis mutantes. Ce résultat démontre donc la présence d'une activité spécifique de B4GALNT2 uniquement chez les brebis prolifiques mutantes. Il a donc été admis que la glycosylation atypique des protéines dans les cellules ovariennes des brebis mutantes était ainsi à la base du mécanisme conduisant à l'augmentation du taux d'ovulation qui caractérise les brebis Lacaune $FecL^L$.

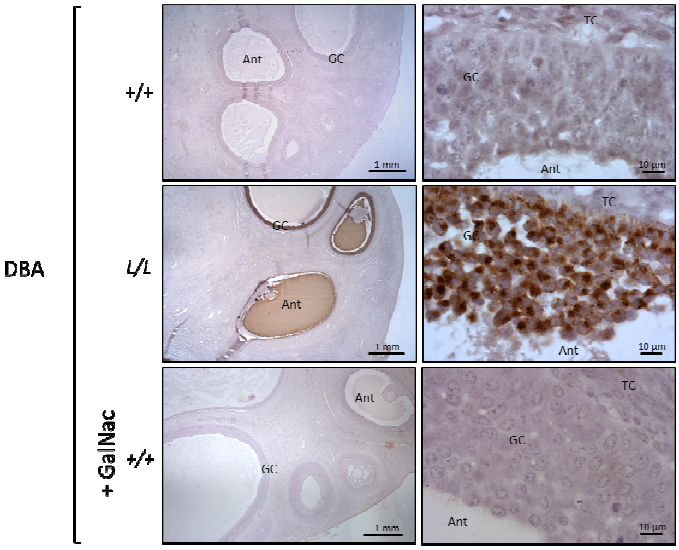

Figure 4. Activité transférase de B4GALNT2 révélée à l'aide d'un marquage par la lectine DBA dans les ovaires de brebis Lacaune +/+ et L/L
GC : cellules de granulosa, TC : cellules de la thèque, Ant : antrum.

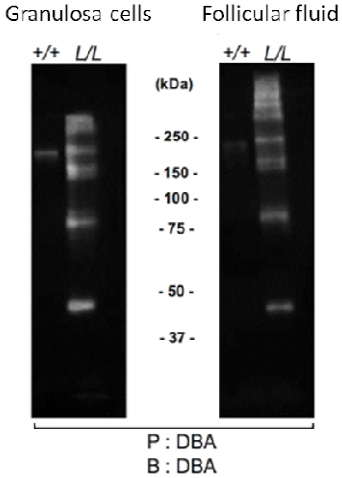

Figure 5. Analyse par Western Immuno-blotting de l'activité transférase de B4GALNT2 dans les cellules de granulosa et les liquides folliculaires de brebis Lacaune +/+ et L/L
Précipitation (P) par la lectine DBA des glycoprotéines cibles de B4GALNT2 à partir d'extraits protéiques de cellules de granulosa et de liquide folliculaire de gros follicules à antrum. Les glycoprotéines purifiées ont été analysées par western-blotting (blotting, B) à l'aide de la lectine DBA biotinylée.

Nous avons ensuite tiré parti du gel de western blot en isolant de celui-ci les protéines glycosylées par B4GALNT2 retrouvées dans les liquides folliculaires L/L pour les identifier par spectrométrie de masse. Nous avons ainsi mis en évidence 10 glycoprotéines, présumées comme les principales cibles de la glycosylation par B4GALNT2. Parmi ces cibles, nous trouvons les sous-unités α et βa de l'inhibine qui

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

conduisent à la formation de l'Activine et de l'inhibine A, deux hormones importantes pour la régulation de la fonction ovarienne (Knight et al., 2012). Toutes deux régulent notamment, de manière antagoniste, la libération de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) au niveau de l'hypohyse, qui elle-même contrôle la croissance et la maturation des follicules ovariens. L'inhibine et l'activine A constituent de fait des candidates privilégiées pour expliquer l'augmentation du taux d'ovulation qui caractérise les brebis Lacaune mutées.

Au niveau des follicules ovariens, l'ensemble des mesures réalisées est en faveur d'une production et d'une accumulation plus importante de l'inhibine A chez les brebis mutées, qui se répercute sur la quantité moyenne d'inhibine A ovarienne par animal, 3 fois plus importante chez les brebis L/L que chez les brebis +/+ (Figure 6A). Mais de manière inattendue, cette plus forte production d'inhibine A ovarienne ne se retrouve pas au niveau plasmatique. Bien au contraire, les concentrations circulantes d'inhibine A sont 3 fois moins importantes chez les brebis L/L en comparaison des brebis +/+ (figure 6B). Il semblerait donc que chez les brebis *FecL*^{L}, la glycosylation atypique de l'inhibine A altère sa biodisponibilité endocrine, que ce soit par un mécanisme de rétention dans les follicules ovariens et/ou une clairance plus élevée dans le plasma, telle est encore la question. Etonnamment, la concentration circulante 3 fois moins importante d'inhibine A chez les brebis L/L n'a pas de répercussion sur les profils endocriniens de l'axe reproductif, notamment sur les concentrations circulantes de FSH (figure 6C) qui restent identiques à celles des brebis +/+. Il semblerait donc que chez les brebis *FecL*^{L}, la glycosylation atypique de l'inhibine A module sa bio-activité.

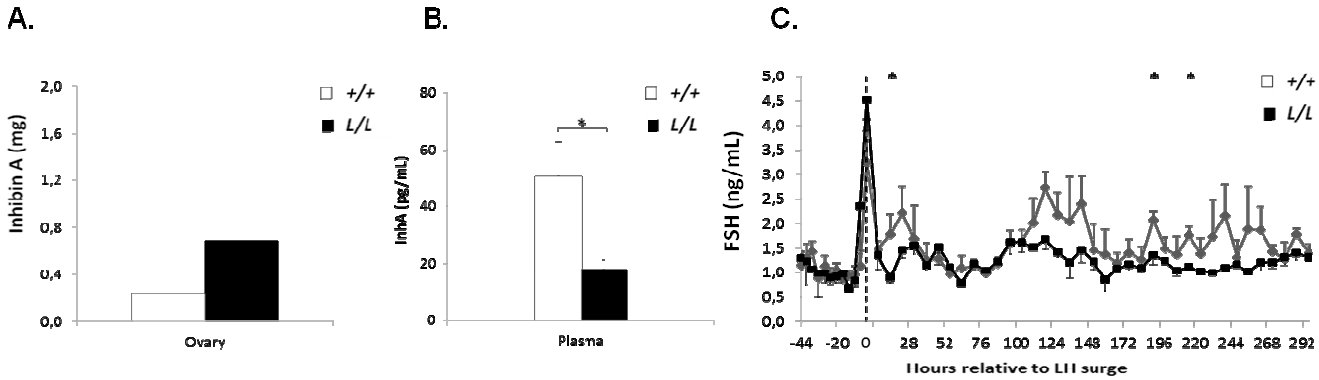

Figure 6. A. Estimation de la production ovarienne en Inhibine A chez des brebis Lacaune +/+ et L/L. Cette estimation prend en compte le nombre moyen de follicules par classe et par animal (+/+ ou L/L), le volume moyen d'un follicule et la concentration en inhibine A intra-folliculaire pour les différentes classes. La somme des quantités moyennes d'inhibine A contenues dans toutes les classes permet ensuite d'obtenir une quantité ovarienne d'inhibine A. B. Concentrations plasmatiques d'inhibine A en phase folliculaire, sur des brebis Lacaune dont le cycle oestrien a été synchronisé. C. Evolution des concentrations plasmatiques moyennes de FSH au cours d'un cycle oestrien synchronisé chez des brebis Lacaune +/+ et L/L.

Ce changement de biodisponibilité et /ou de bio-activité de l'inhibine A, pourrait modifier son rôle dans la régulation de la fonction ovarienne et ainsi conduire à une augmentation du nombre d'ovulations chez les brebis hyper-prolifiques L/L (Mansanet, 2013).

En conclusion, pour répondre aux objectifs l'association de multiples approches de génétique, de biologie fonctionnelle et de physiologie m'a permis d'identifier deux mutations constituant l'haplotype causal *FecL*^{L} et *B4GALNT2* comme étant le gène *FecL*. La mutation induit la surexpression de B4GALNT2 dans les ovaires, ce qui conduit à la glycosylation atypique de l'inhibine A qui *in fine* voit sa bio-dispinibilité et/ou sa bio-activité changées. Ces changements conduisent par des mécanismes encore non identifiés à l'augmentation du nombre d'ovulations à l'origine du phénotype hyperprolifique chez les brebis mutées L/L.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.

L'information génétique acquise à été suffisante pour une perspective appliquée dans le domaine agronomique, avec le développement à grande échelle d'un nouveau test ADN pour le génotypage des animaux Lacaune par des entreprises de sélection de la race. Grâce à ce génotypage systématique, il a été possible de mieux comprendre la diffusion de la mutation dans les cheptels et ses conséquences (Martin et al, 2014), et donc de proposer le schéma de sélection permettant de garantir une rentabilité économique durable. En race Lacaune, il a ainsi été préconisé de maintenir 50% de brebis hétérozygotes mutées dans les troupeaux pour obtenir l'optimum économique. Cette sélection assistée par marqueur devient alors un outil de gestion précis et rapide de la prolificité au sein des schémas de sélection de la race. Il a par ailleurs permis de mettre en évidence la présence de la mutation $FecL^L$ dans d'autres races (Noire du Velay, …) et donc de mettre en place ce même travail d'accompagnement dans les schémas de sélection de ces races.

D'un point de vue cognitif, ce travail à mis en évidence la glycosylation comme un nouveau mécanisme de contrôle du nombre d'ovulation. Il reste encore à comprendre comment une glycosylation peut moduler le rôle d'une hormone. D'un point de vue appliqué, ce travail chez la brebis Lacaune pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine de la procréation médicalement assistée, en s'intéressant aux glycosylations atypiques qui pourraient accompagner les disfonctionnements ovariens. Cela pourrait permettre d'identifier de nouveaux gènes cibles et leur mutations associées à des cas d'infertilité ou de sub-fertilité comme les insuffisances ovariennes précoces ou encore les syndromes d'ovaires polykystiques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) DROUILHET L, LECERF F, BODIN L, FABRE S, MULSANT P., 2009. – Fine mapping of the FecL locus influencing prolificacy in Lacaune sheep. *Animal genetics*; **40**, 804-812.

(2) DROUILHET L*, MANSANET C*, DROUILHET L*, SARRY J, TABET K, BARDOU P, WOLOSZYN F, LLUCH J, HARICHAUX G, VIGUIÉ C, MONNIAUX D, BODIN L, MULSANT P, FABRE S., 2013. – The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the B4GALNT2 gene within the ovary. *PLoS Genet*. **9**(9).

(3) FABRE S, PIERRE A, MULSANT P, BODIN L, DI PASQUALE E, PERSANI L, MONGET P, MONNIAUX D., 2006. – Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, **4**, 20.

(4) KNIGHT PG, SATCHELL L, GLISTER C., 2012. – Intra-ovarian roles of activins and inhibins. *Molecular and cellular endocrinology*. **359**, 53-65.

(5) MAIJALA K, ÖSTERBERG S., 1977. – Productivity of pure Finnsheep in Finland and abroad. L*ivestock Production Science*, **4**, 355-377.

(6) MANSANET C., 2013. – Contrôle génétique et physiologique de la prolificité en race ovine Lacaune : caractérisation de la mutation causale et rôle fonctionnel du gène FecL. (*Thèse de doctorat en Sciences de la vie et de la santé : Université de Tours).*150 p. Disponible sur https://onedrive.live.com/redir?resid=3359827EAAE98448!11972&authkey=!AM_ubxPEM_Dhh6g&ithint=file%2cpdf
Analyse disponible sur http://academie-agriculture.fr/publications/presentation-theses

(7) MARTIN P, RAOUL J, BODIN L., 2014. – Effects of the FecL major gene in the Lacaune meat sheep population. *Genetics Selection Evolution*; 46,48.

(8) RICORDEAU G, THIMONIER J, POIVEY J, DRIANCOURT M, HOCHEREAU-DE-REVIERS M, TCHAMITCHIAN L., 1990. – INRA. Research on the Romanov sheep breed in France : a review. *Livestock Production Science;***24**, 305-332.

(9) VINET A, DROUILHET L, BODIN L, MULSANT P, FABRE S, PHOCAS F., 2012. – Genetic control of multiple births in low ovulating mammalian species. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*; **23**, 727-740.

Copyright – Académie d'Agriculture de France, 2015.