

Régulation du taux d'ovulation chez les mammifères femelles : exemple des gènes de prolificité chez les ovins

Regulation of the ovulation rate in female mammals: example of prolificity genes in sheep

Par Philippe MULSANT⁽¹⁾
(communication présentée le 20 octobre 2005)

RÉSUMÉ

Le mouton peut être considéré comme une espèce modèle pour l'étude du contrôle du taux d'ovulation. En effet, cette espèce présente une grande variabilité génétique du taux d'ovulation et donc, de la taille des portées. Dans de nombreux cas, il a été montré que cette variabilité était due à la mutation d'un seul gène. À ce jour, sept de ces mutations ont été identifiées : elles affectent trois gènes, *BMP15*, *GDF9* et *BMPR-1B*. Ces trois gènes font partie d'une même voie de régulation par les BMP (bone morphogenetic proteins) dont le rôle ovarien était insoupçonné. L'analyse de mutations naturelles a démontré que certaines protéines de la famille des BMP avaient une double action, étant d'abord indispensables au développement précoce du follicule ovarien et inhibant ensuite sa différenciation hormono-dépendante. L'identification de l'ensemble des mutations mises en évidence devrait permettre de vérifier le rôle exceptionnel de ce « système BMP » ou d'identifier d'autres gènes clés du contrôle de leur taux d'ovulation par les femelles des mammifères.

Mots-clés : reproduction, mutation, mouton, ovaire.

SUMMARY

Sheep provides an interesting model to study ovulation rate control, as this species is associated with a wide genetic variability of its ovulation rate, and hence of the size of its litter. This variability has been shown in numerous cases to be due to the mutation of a single gene. To date, seven mutations have been identified in three different genes: BMP15, GDF9 and BMPR-1B. These three genes belong to the same regulatory pathway involving BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), whose role in ovarian development was so far unsuspected. The analysis of these natural ovine mutants demonstrated that certain proteins of the BMP family play a dual role, first as key promoters of early ovarian folliculogenesis and afterwards as inhibitors of its hormone-dependent differentiation. Identifying all the mutations uncovered may confirm the exceptional role of the "BMP system", or reveal new genes involved in ovulation rate control in female mammals.

Key words: reproduction, mutation, sheep, ovary.

(1) Laboratoire de Génétique Cellulaire, INRA, Centre de recherches de Toulouse, BP 52627, 31326 Castanet, France.

Chez les mammifères, le taux d'ovulation de chaque espèce est défini assez précisément ; par contre, il varie fortement entre espèces. Il est à peine supérieur à un chez la femme, la vache et la brebis, il dépasse largement 20 chez la truie. Les mécanismes physiologiques qui contrôlent ce taux et ses variations sont encore largement inconnus. De ce point de vue, l'espèce ovine peut être considérée comme une espèce modèle, car elle présente une grande variabilité de la prolificité (et donc du taux d'ovulation) et la ségrégation de différentes mutations affectant fortement la prolificité, *via* une augmentation du taux d'ovulation a été observée (FAHMI, 1996). La plus ancienne de ces mutations, à un locus appelé *FecB* ou Booroola, a été mise en évidence au début des années 1980 (DAVIS *et al.*, 1982, PIPER et BINDON, 1982). À l'époque, l'hypothèse d'une seule mutation élevant fortement la taille de portée, sans avoir d'autre effet particulier sur les animaux porteurs, était révolutionnaire, la reproduction étant considérée comme un caractère trop complexe pour pouvoir être modifié par la mutation d'un seul gène. Depuis, des mutations ayant un effet majeur sur le taux d'ovulation, ont été observées dans de nombreuses races ovines notamment, islandaise (Thoka et Ola), Romney (Hanna et Inverdale), javanaise, Olkuska, Cambridge, Belclare, Lacaune, Coopworth (Woodlands), (revue récente *in* : DAVIS, 2005). Dans tous ces cas, l'existence d'un gène majeur a été démontrée par des méthodes purement statistiques, en analysant la distribution des valeurs phénotypiques, le plus souvent la taille de portée, mesurées dans la descendance d'animaux exceptionnels. Des programmes d'identification des mutations causales correspondantes ont récemment abouti à la découverte de sept mutations touchant trois gènes. De façon inattendue, ces trois gènes (BMPR-1B, BMP15 et GDF9) font partie d'un même système de régulation par les Bone Morphogenetic Proteins (BMP), qui a donc un rôle majeur dans le contrôle du taux d'ovulation des femelles. Dans ce mémoire, nous rappellerons les différentes étapes ayant mené de la mise en évidence des principales mutations à l'élucidation de leur nature. Nous présenterons ensuite une vue, qui reste encore très fragmentaire, du mode d'action de ces protéines dans le contrôle du taux d'ovulation.

• BOORoola (*FECB*)

Cette mutation fut mise en évidence dans un élevage australien de Mérinos, appelé Booroola, d'où son nom. Les éleveurs, les frères Sears, importaient régulièrement des béliers, qu'ils croisaient avec leurs brebis prolifiques. L'hypothèse d'une hérédité polygénique expliquait mal le maintien d'une forte fréquence de femelles prolifiques dans cet élevage. PIPER et BINDON (1982) firent l'hypothèse d'un gène majeur dont la mutation aboutissait à une prolificité accrue ; la même observation fut faite par DAVIS *et al.* (1982) sur la base du taux d'ovulation. La mutation apparaissait additive pour le taux d'ovulation (une copie de l'allèle muté augmentant le taux d'ovulation d'environ 1,5) et partiellement dominante pour la taille de portée.

La course au gène

Des reproducteurs porteurs de la mutation furent fournis à de nombreux pays (THIMONIER *et al.*, 1991), permettant la multiplication des études physiologiques et génétiques. Il apparut assez rapidement que les femelles porteuses avaient des follicules ovulatoires plus petits que les femelles non porteuses. Les autres effets de la mutation restaient peu clairs, qu'il s'agisse des taux d'hormones circulants ainsi que du ou des tissus où le gène s'exprimait. Par ailleurs, les mâles porteurs ne manifestaient pas de caractéristique particulière liée à la mutation. Bien que nombreuses, les analyses physiologiques ne fournissaient pas d'indication sur la nature du gène en cause. En parallèle, des programmes de clonage positionnel furent entrepris dans différents pays, Australie, Nouvelle-Zélande, France, Grande Bretagne et Etats-Unis. Le plus souvent, des béliers présumés hétérozygotes étaient croisés avec des brebis peu prolifiques, ce qui correspondait de fait à un backcross, et les filles étaient génotypées pour la mutation, selon leur taux d'ovulation (deux fois trois mesures à un an d'intervalle). La pénétrance de la mutation n'étant pas totale, seules les brebis situées aux extrêmes de la distribution étaient conservées pour l'analyse génétique. Par exemple, en France, treize béliers porteurs servirent à inséminer des brebis Mérinos d'Arles faiblement prolifiques, fournissant *in fine* 400 filles considérées comme informatives, sur un millier de femelles produites. Pour des raisons techniques –manque de marqueurs, lourdeur des analyses– les différents programmes génétiques progressèrent lentement, et il fallut attendre onze ans pour que la mutation soit localisée par MONTGOMERY *et al.* (1993) qui identifièrent quatre marqueurs liés. En 1994, le même groupe néo-zélandais montrait que ces marqueurs étaient situés sur le chromosome 6 ovin (MONTGOMERY *et al.*, 1994), dans une région orthologue d'une partie du bras long du chromosome humain 4 (LANNELUC *et al.*, 1996 ; LORD *et al.*, 1996). Une forte conservation régionale de l'ordre des gènes entre l'homme et l'espèce ovine, la plus grande disponibilité de marqueurs génétiques et l'obtention de banques de grands fragments d'ADN allaient, dès lors, permettre à trois équipes (INRA en France, AgResearch en Nouvelle-Zélande et l'Université d'Edinburgh en Ecosse) d'aboutir presque simultanément à la découverte de la mutation causale (MULSANT *et al.*, 2001 ; WILSON *et al.*, 2001 ; SOUZA *et al.*, 2001). La mutation découverte était une mutation ponctuelle dans la séquence codante du récepteur de type IB des BMP, BMPR-IB, qui remplace la glutamine présente en position 249 dans la protéine normale par une arginine (Q249R). La même mutation sera par la suite retrouvée dans des races asiatiques (la Garole indienne, la javanaise et la Han chinoise) où elle est également associée à un accroissement de la prolificité (DAVIS *et al.*, 2002).

Effets de la mutation

La mutation Q249R est située dans le domaine intracellulaire du récepteur BMPR-IB, mais ne semble pas toucher un des acides aminés « critiques ». Ce récepteur est certes exprimé dans le follicule ovarien mais également dans de

nombreux autres tissus (WILSON *et al.*, 2001) et son implication a été démontrée dans le développement embryonnaire précoce, ainsi que dans la formation des cartilages. Or la seule manifestation claire de la mutation ovine est l'augmentation du taux d'ovulation. Il a donc été présumé que la mutation Q249R devait modifier principalement l'activité ovarienne du récepteur. De fait, une modélisation moléculaire de la protéine a indiqué une modification potentielle de la liaison entre la protéine BMPR-IB et une protéine régulatrice, FKBP12 (MULSANT *et al.*, 2001). Des études *in vitro* ont par ailleurs montré (i) que des cellules de la granulosa prélevées sur des brebis homozygotes mutées étaient moins sensibles à des BMP que des cellules provenant d'animaux de type sauvage et (ii) que cette moins grande sensibilité était retrouvée dans des expériences de transfert de gène, sauvage ou muté, dans des cellules en culture (MULSANT *et al.*, 2001 ; FABRE *et al.*, 2003).

• LES AUTRES MUTATIONS

Inverdale et Hanna (*FecX*)

Ces deux mutations furent mises en évidence dans la race Romney (DAVIS *et al.*, 1991). Dans les deux cas, un mâle porteur transmettait la mutation à toutes ses filles mais à aucun de ses fils, indiquant la probable localisation du gène affecté sur le chromosome X (d'où le nom de *FecX* donné au locus). Ces deux mutations présentaient en outre une caractéristique commune : les femelles homozygotes étaient stériles. Un croisement spécifique fut mis en place, dans lequel des béliers mutés étaient croisés avec des femelles hétérozygotes. Les descendantes pouvaient être classées sans ambiguïté, les hétérozygotes étant prolifiques et les homozygotes toutes stériles. L'analyse de ce pedigree permit à des groupes néo-zélandais et finlandais, dès 2000, soit un an avant l'élucidation de la nature de la mutation Booroola, d'identifier deux mutations dans la protéine *BMP15* : un stop précoce chez les animaux Hanna et une substitution à la position 31 chez les Inverdale (GALLOWAY *et al.*, 2000). Les deux mutations produisent le même phénotype et ne complètent pas car les brebis porteuses d'un exemplaire de chaque mutation sont stériles ; il est donc estimé que dans les deux cas, stop et mutation ponctuelle, il n'y pas de protéine *BMP15* fonctionnelle.

Belclare et Cambridge (*FecX* et *FecG*)

Dans ces deux populations, des observations similaires à celles indiquées ci-dessus avaient été faites, en particulier la ségrégation d'animaux prolifiques et stériles. Toutefois, la présence de femelles avec des taux d'ovulation très élevés, ainsi que certaines anomalies dans le schéma de transmission, avaient amené Hanrahan, dès 1991, à postuler que l'hypothèse d'une seule mutation était probablement simplificatrice et que les phénotypes observés pouvaient correspondre à la ségrégation de plusieurs allèles d'un même gène, voire de plusieurs gènes (HANRAHAN, 1991). De fait, une étude menée par un consortium, réunissant Irlandais, Néo-Zélandais et Français, aboutit à l'identification de trois mutations dif-

férentes. Deux de ces mutations touchaient encore *BMP15*, un stop précoce différent de Hanna, et une substitution en position 99. La troisième mutation est une substitution dans un autre gène, autosomique, *GDF9*, qui code une protéine voisine de *BMP15* (HANRAHAN *et al.*, 2004). Les brebis stériles étaient homozygotes pour la mutation de *GDF9* ou présentaient deux allèles mutés de *BMP15*.

Lacaune (*FecL* et *FecX*)

Dans les années 1970, un programme de sélection de la prolificité fut mis en place par la coopérative Ovitest sur un des rameaux de cette race (Lacaune viande). Les résultats de la sélection, sa rapidité, ainsi que de fortes disparités de la variance des tailles de portée intra-famille et entre familles, pouvaient laisser penser à la ségrégation d'une mutation à fort effet. Un croisement backcross sur d'autres femelles Lacaune non prolifiques fut mis en place et aboutit effectivement à des distributions bimodales du taux d'ovulation des descendantes de certains mâles (BODIN *et al.*, 2002). Sur le même dispositif, un criblage complet du génome à l'aide d'une batterie de marqueurs microsatellites permit de montrer que ce gène autosomique, appelé *FecL*, était situé sur le chromosome 11 ovin et qu'il s'agissait donc d'un autre gène que ceux précédemment identifiés (LECERF *et al.*, 2002). Cette mutation se comporte de façon codominante pour le taux d'ovulation, comme la mutation Booroola. La nature du gène muté et celle de la mutation causale sont actuellement en cours d'étude. Par ailleurs, dans un échantillon de brebis à taille de portée et taux d'ovulation extrêmes, il a été retrouvé une mutation supplémentaire dans la séquence codante de *BMP15*, qui remplace la cystéine en position 53 par une tyrosine. Les phénotypes associés à cette mutation sont les mêmes que ceux observés précédemment pour les autres mutations connues de ce gène : prolificité accrue des hétérozygotes et stérilité des homozygotes (données non publiées). Deux mutations, l'une, autosomique au locus *FecL* et l'autre, liée au sexe, interviennent donc dans le niveau de prolificité des brebis Lacaune.

Bilan

Trois gènes, et sept mutations différentes, ont donc été identifiés à ce jour (tableau 1). Deux autres gènes ont été localisés et sont différents. Le premier est le gène autosomique muté chez les animaux Lacaune. Le second, trouvé en race Coopworth et appelé Woodlands ou *FecX2*, est situé sur le chromosome X. Il diffère clairement du gène *FecX* (*BMP15*) car il présente un phénomène complexe d'empreinte de type maternel (DAVIS *et al.*, 2001). Pour le moment, il apparaît un excès de mutations de *BMP15* (5 sur 7). Cet excès est en partie un artefact, les programmes génétiques commençant souvent par le test des gènes déjà identifiés. D'autre part, le gène étant porté par le chromosome X, un mâle muté transmet la mutation à toutes ses filles, ce qui a sans doute favorisé la sélection de tels animaux par les éleveurs. Une autre caractéristique de ces mutations est l'additivité de leurs effets : des brebis double hétérozygotes ont été obtenues pour différentes combinaisons de mutations (Booroola et *BMP15*, *GDF9* et

Locus	Chromosome	Gène	Mutations	Nom courant (race)
<i>FecX</i>	X	<i>BMP15</i>	V31D Q23stop S99I Stop C53Y	Inverdale (Romney) Hanna (Romney) Belclare (Belclare, Cambridge) Galway (Belclare, Cambridge) Lacaune
<i>FecG</i>	5	<i>GDF9</i>	S77F	High Fertility (Belclare, Cambridge)
<i>FecB</i>	6	<i>BMPR-IB</i>	Q249R	Booroola (Mérinos, Garole, Javanaise, Han)
<i>FecL</i>	11	nc	nc	Lacaune
<i>FecX2</i>	X	nc	nc	Woodlands (Coopworth)

Tableau 1 : Mutations ovines, identifiées ou localisées, agissant sur le taux d'ovulation. La numérotation des positions est celle des acides aminés de la protéine mature. nc : non connu.

BMP15, *FecL* et *BMP15*, notamment). Ces animaux ont des taux d'ovulation très élevés, allant jusqu'à des moyennes de 12. Il apparaît donc que le niveau du taux d'ovulation peut être profondément modifié, au moins dans l'espèce ovine, par l'addition des effets de seulement deux mutations.

Pour le moment, les gènes identifiés appartiennent tous les trois à un même système : il s'agit de deux protéines de la famille des BMP et d'un récepteur de BMP. Le nom de cette famille de protéines, proches du TGF β , vient de leur premier rôle découvert, celui de régulateurs de la différenciation osseuse. Les mutants ovins de prolificité indiquent que certaines de ces protéines jouent également un rôle fondamental dans le contrôle de la différenciation du follicule ovarien.

• MODE D'ACTION DE BMP DANS L'OVAIRE

Expression ovarienne

Différentes protéines de cette famille sont exprimées dans le follicule ovarien, principalement par l'ovocyte et la granulosa (revue de McNATTY *et al.*, 2005a). Le résultat le plus remarquable est que *GDF9* et *BMP15* ne sont exprimées que par l'ovocyte. Les mutants de *BMP15* et *GDF9* présentent un développement folliculaire anormal, avec arrêt des follicules respectivement au stade primaire et au stade préantral. Des vaccinations contre *BMP15* ou *GDF9* aboutissent à des phénotypes similaires à ceux des mutants correspondants (JUENGEL *et al.*, 2002 ; 2004). Suivant l'intensité du traitement, l'ovulation était augmentée ou bloquée. Il apparaît donc que ces deux facteurs sont essentiels au développement folliculaire à deux stades différents. D'autre part, l'expression restreinte à l'ovocyte de ces deux gènes explique bien l'absence de manifestation particulière des mutations de *GDF9* ou *BMP15* chez les mâles porteurs. Le taux d'ovulation accru, observé chez les hétérozygotes pour l'une ou l'autre de ces mutations, demeure moins bien expliqué. Le groupe de Shimasaki a montré que ces facteurs diminuaient la réponse des cellules folliculaires à la FSH, par inhibition de la synthèse du récepteur de la FSH (OTSUKA *et al.*, 2001). Ces deux protéines auraient ainsi un double rôle, étant indispensables au développement folliculaire à des stades pré-

coces de celui-ci, puis freinant la différenciation hormono-dépendante (McNATTY *et al.*, 2005b).

La sous-unité *BMPR-IB* est exprimée dans l'ovocyte, les cellules de la granulosa et peut-être les cellules de la thèque (McNATTY *et al.*, 2005a). Il a été montré que la mutation Q249R diminuait *in vitro* la sensibilité cellulaire à des BMP (MULSANT *et al.*, 2001 ; FABRE *et al.*, 2003). Dans l'hypothèse faite précédemment d'une inhibition, par des BMP, de la différenciation terminale, la mutation permettrait aux follicules des animaux mutés d'être moins sensibles à ce frein. Toutefois, l'analyse est compliquée par notre méconnaissance des ligands réels de ce récepteur dans le follicule ovarien. En particulier, nous ne savons pas si *BMPR-IB* est ou non le récepteur de *GDF9* ou de *BMP15*. Il est d'ailleurs possible que les rôles successifs de stimulation de la croissance, puis d'inhibition de la différenciation de ces deux protéines, correspondent à des fixations sur des récepteurs différents, étant donnée la redondance des récepteurs de BMP dans le follicule.

Variabilité entre espèces

Des données existent chez la souris, la femme et de façon préliminaire, chez la vache. Les trois gènes *BMP15*, *GDF9* et *BMPR-IB* ont été inactivés chez la souris (YI *et al.*, 2001 ; DONG *et al.*, 1996 ; YAN *et al.*, 2001). Les effets de ces mutations sur la reproduction des femelles sont indiqués dans le **tableau 2**. Les souris homozygotes pour le knock-out de *BMPR-IB* sont quasi-stériles et présentent un développement anormal des doigts, ce qui confirme les rôles multiples de ce récepteur. Il est probable que le phénotype particulier des mutants Booroola est dû à la nature même de la mutation. Par contre, les différences entre les mutants naturels ovins de *GDF9* et de *BMP15* et les mutants murins inactivés sont sans doute le reflet de stratégies différentes entre espèces : *BMP15* et *GDF9* seraient indispensables au développement folliculaire chez la brebis, tandis que *GDF9* serait le facteur nécessaire chez la souris.

Deux mutations de *BMPR-IB* ont été trouvées chez l'homme, dans des cas de brachydactylie familiale de type 2 (LEHMANN *et al.*, 2003). Les deux mutations corres-

Espèce	Génotype	GDF9	BMP15	BMPR-IB
Mouton	+ / m	+ 2	+ 1	+ 1,5
	m / m	0	0	+ 3
Souris	+ / KO	-	=	=
	KO / KO	0	-	= *

Tableau 2 : Comparaison des effets des mutations naturelles ovines (m) et des inactivations de gènes de la souris (KO) sur le taux d'ovulation des femelles. +1: taux d'ovulation augmenté d'une unité par rapport aux témoins; =: pas d'effet; -: taux d'ovulation diminué, **0** : pas d'ovulation; * : femelles à taux d'ovulation normal, mais quasi-stériles pour d'autres raisons.

pondent à des domaines de la molécule différents de la région mutée chez les animaux Booroola. Les auteurs signalent que les femelles atteintes n'ont pas un nombre d'enfants significativement différent de celui des témoins. Une mutation de *BMP15* a été récemment décrite (DI PASQUALE, BECK-PECCOZ et PERSANI, 2004). Les femelles porteuses de la mutation à l'état hétérozygote sont stériles. L'explication de ce phénotype particulier serait que la mutation, située en amont de la protéine mature, bloquerait le processing de celle-ci, y compris de la protéine normale.

Des « vaches à jumeaux » ont été décrites, en particulier en race Holstein et en Maine-Anjou. Le phénotype paraît une réplique atténuée de celui des brebis prolifiques, dans la mesure où ces animaux ont, de façon répétée mais non systématique, des jumeaux, avec un taux d'ovulation qui dépasse rarement deux. Des QTL ont été mis en évidence sur différents chromosomes (CRUICKSHANK *et al.*, 2004) mais aucune mutation causale n'a encore été identifiée.

• CONCLUSION

L'identification des mutations naturelles ovines de prolificité a démontré le rôle fondamental des BMP dans l'ovaire et ouvert un champ d'étude nouveau en biologie de la reproduction. Ces mutations sont déjà utilisées en sélection, de façon encore mesurée. Cela tient pour partie aux caractéristiques propres des mutations identifiées : l'effet est parfois considéré comme trop fort et trop variable. D'autre part, des mutations entraînant une stérilité des femelles homozygotes demandent un mode de gestion particulier. Enfin, quand différentes mutations sont en ségrégation dans la même population, les brebis porteuses de deux mutations différentes ont en général des taux d'ovulation extrêmement élevés, avec apparition de portées trop nombreuses. Il reste que ce type de mutation peut être introgressé dans différentes races, en gardant, ou du moins en retrouvant rapidement, les caractéristiques propres à la race receveuse, tout en améliorant immédiatement la prolificité. Certains, en particulier en Nouvelle-Zélande, placent également des espoirs dans une vaccination modérée, afin de mimer, dans des races peu prolifiques, l'effet de ces mutations. Par ailleurs, une dizaine de mutations ont été mises en évidence dans différentes races, sans être encore identifiées. Dans les deux cas de la mutation Woodlands et de la mutation autosomique au locus *FecL*, nous savons déjà que les gènes en cause sont différents. L'élucidation de ces mutations devrait donc fournir d'autres « gènes-clés » du développement folliculaire, qu'ils appartiennent ou non au même système de contrôle par les BMP. Enfin, il apparaît que ce rôle ovarien de BMP n'est pas propre à l'espèce ovine, même si d'importantes différences entre espèces ont été démontrées. L'étude de ce « système BMP » dans différentes espèces devrait grandement faire progresser nos connaissances de la biologie de la reproduction et permettra sans doute de mieux maîtriser celle-ci, en particulier chez l'homme.

REMERCIEMENTS

L'auteur tient à remercier tous les membres des programmes français d'étude des gènes de prolificité, en particulier Jean-Michel Elsen qui en fut pendant de nombreuses années l'inspirateur, puis le coordinateur.

BIBLIOGRAPHIE

- BODIN L, SANCRISTOBAL M, LECERF F, MULSANT P, BIBE B, LAJOUS D, BELLOC JP, EYCHENNE F, AMIGUES Y, ELSESEN JM (2002) Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep. *Genet. Sel. Evol.*, **34**, 447-464.
- CRUICKSHANK J, DENTINE MR, BERGER PJ, KIRKPATRICK BW (2004) Evidence for quantitative trait loci affecting twinning rate in North American Holstein cattle. *Anim. Genet.*, **35**, 206-212.
- DAVIS GH (2005) Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.*, **27**, S11-S23.
- DAVIS GH, DODDS KG, WHEELER R, JAY NP (2001) Evidence that an imprinted gene on the X chromosome increases ovulation rate in sheep. *Biol. Reprod.*, **64**, 216-221.
- DAVIS GH, GALLOWAY SM, ROSS IK, GREGAN SM, WARD A, NIMBKAR BV, GHALSASI PM, NIMBKAR C, GRAY GD, SUBANDRIYO, INOUNU I, TIESNAMURTI B, MARTYNIUK E, EYTHORS DOTIR E, MULSANT P, LECERF F, HANRAHAN JP, BRADFORD GE, WILSON T (2002) DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biol. Reprod.*, **66**, 1869-1874.
- DAVIS GH, McEWAN JC, FENNESSY PF, DODDS KG, FARQUHAR PA (1991) Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. *Biol. Reprod.*, **44**, 620-624.
- DAVIS GH, MONTGOMERY GW, ALLISON AJ, KELLY RW, BRAY AR (1982) Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *N. Z. J. Agric. Res.*, **25**, 525-529.
- DI PASQUALE E, BECK-PEC-COZ P, PERSANI L (2004) Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15). *Am. J. Hum. Gene.*, **75**, 106-111.
- DONG J, ALBERTINI DF, NISHIMORI K, KUMAR TR, LU N, MATZUK MM (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, **383**, 531-535.
- FABRE S, PIERRE A, PISSELET C, MULSANT P, LECERF F, POHL J, MONGET P, MONNIAUX D (2003) The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor-IB functionality. *J. Endocrinol.*, **177**, 435-444.
- FAHMI MH (1996) *Prolific Sheep*. CAB International, Oxon, 542 pp.
- GALLOWAY SM, McNATTY KP, CAMBRIDGE LM, LAITINEN MP, JUENGEL JL, JOKIRANTA TS, McLAREN RJ, LUIRO K, DODDS KG, MONTGOMERY GW, BEATTIE AE, DAVIS GH, RITVOS O (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.*, **25**, 279-283.
- HANRAHAN JP (1991) Evidence for single gene effects on ovulation rate in the Cambridge and Belclare breeds. In: ELSESEN JM, BODIN L, THIMONIER J, éditeurs. *Major genes for reproduction in sheep*. INRA, Paris, France, 93-102.
- HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN M, DAVIS GH, POWELL R, GALLOWAY SM (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.*, **70**, 900-909.
- JUENGEL JL, HUDSON NL, HEATH DA, SMITH P, READER KL, LAWRENCE SH, O'CONNELL KR, LAITINEN MP, CRANFIELD M, GROOME NP, RITVOS O, McNATTY KP (2002) Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.*, **67**, 1777-1789.
- JUENGEL JL, HUDSON NL, WHITING L, McNATTY KP (2004) Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.*, **70**, 557-561.
- LANNELUC I, MULSANT P, SAIDI-MEHTAR N, ELSESEN JM (1996) Synteny conservation between part of human chromosome 4q and ovine and bovine chromosomes 6. *Cytogenet. Cell Genet.*, **72**, 212-214.
- LECERF F, MULSANT P, ELSESEN JM, BODIN L (2002) Localisation and mapping of a major gene controlling ovulation rate in Lacaune sheep. In: *Proceedings 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Montpellier, 19-23 august 2002. INRA, Castanet, France., **30**, 753-756.
- LEHMANN K, SEEMANN P, STRICKER S, SAMMAR M, MEYER B, SURING K, MAJEWSKI F, TINSCHER S, GRZESCHIK KH, MULLER D, KNAUS P, NURNBERG P, MUNDLOS S (2003) Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12277-12282.
- LORD EA, LUMSDEN JM, DODDS KG, HENRY HM, CRAWFORD AM, ANSAN HA, PIERCE PD, MAHER DW, STONE RT, KAPPES SM, BEATTIE CW, MONTGOMERY GW (1996) The linkage map of sheep Chromosome 6 compared with orthologous regions in other species. *Mamm. Genome*, **7**, 373-376.
- McNATTY KP, GALLOWAY SM, WILSON T, SMITH P, HUDSON NL, O'CONNELL A, BIBBY AH, HEATH DA, DAVIS GH, HANRAHAN JP, JUENGEL JL (2005a) Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet. Sel. Evol.*, **37**, s25-s38.
- McNATTY KP, JUENGEL JL, READER KL, LUN S, MYLLYMAA S, LAWRENCE SB, WESTERN A, MEERASAHIB MF, MOTTERSHEAD DG, GROOME NP, RITVOS O, LAI-

TINEN MP (2005b) Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. *Reproduction*, **129**, 481-487.

- MONTGOMERY GW, CRAWFORD AM, PENTY JM, DODDS KG, EDE AJ, HENRY HM, PIERSON CA, LORD EA, GALLOWAY SM, SCHMACK AE, SISE JA, SWARBRICK PA, HANRAHAN V, BUCHANAN FC, HILL DF (1993) The ovine Booroola fecundity gene (*FecB*) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nat. Genet.*, **4**, 410-414.

- MONTGOMERY GW, LORD EA, PENTY JM, DODDS KG, BROAD TE, CAMBRIDGE JM, SUNDER SLF, STONE RT, CRAWFORD AM (1994) The Booroola fecundity (*FecB*) gene maps to sheep chromosome 6. *Genomics*, **22**, 148-153.

- MULSANT P, LECERF F, FABRE S, SCHIBLER L, MONGET P, LANNALUC I, PISSELET C, MONNIAUX D, CALLEBAUT I, CRIBIU E, THIMONIER J, TEYSSIER J, BODIN L, COGNIE Y, CHITOUR N, ELSESEN JM (2001) Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation in Booroola ewes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 5104-5109.

- OTSAKA F, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S (2001) Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11387-11382.

- PIPER LR, BINDON BM (1982) The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. In: PIPER LR, BINDON BM, NETHERY RD, Editors. *The booroola Merino*, CSIRO, Melbourne, 9-20.

- THIMONIER J, DAVIS GH, FAHMY MH, CASTONGUAY F, FERNANDEZ-ABELLA D, GREEF JC, HOFMEYR JH, GOOTWINE E, BOR A, BRAW-TAL R, HALEY CS, KLEWIEC J, GABRYSZUKA M, SLOWAK M, PIPER LR, BINDON BM, VERESS L, LENGYEL A, PASZTHY G, HORN P, VISSCHER AH, WASSMUTH R, YOUNG LD (1991) The F gene in the world: Use and research objectives. In: ELSESEN JM, BODIN L, THIMONIER J, éditeurs. *Major genes for reproduction in sheep*. INRA, Paris, France, 3-13.

- SOUZA CJH, MACDOUGAL C, CAMPBELL BK, McNEILLY AS, BAIRD DT. (2001) The Booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type IB (BMPRII) gene. *J. Endocrinol.*, **169**, 81-86.

- WILSON T, WU XY, JUENGEL JL, ROSS IK, LUMSDEN JM, LORD EA, DODDS KG, WALLING GA, McEWAN JC, O'CONNELL AR, McNATTY KP, MONTGOMERY GW (2001) Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, **64**, 1225-1235.

- YAN C, WANG P, DEMAYO J, DEMAYO FJ, ELVIN JA, CARINO C, PRASAD SV, SKINNER SS, DUNBAR BS, DUBE JL, CELESTE AJ, MATZUK MM (2001) Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol. Endocrinol.*, **15**, 854-866.

- YI SE, LAPOLT PS, YOON BS, CHEN JYL, LU JKH, LYONS KM (2001) The type I BMP receptor Bmpr1B is essential for female reproductive function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7994-7999.

