

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé ED 258

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 1061 INRA, Génétique Moléculaire Animale

THESE N°32

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Lydie ROUHAUD

Le 23 Novembre 2004

« Organisation, expression et polymorphismes des gènes
ACVR2B et *FST*, intervenant dans la voie de signalisation de la
myostatine (GDF-8). »

Directeur de Thèse : Pr Raymond Julien

Jury :

Rapporteurs :	Mme Roberta CIAMPOLINI	Docteur, Faculté de Médecine Vétérinaire, Pise
	Mr Michel DUCLOS	Chargé de Recherche (CR1), INRA
Examineurs :	Mr Jean-Pierre BIDANEL	Directeur de Recherche, INRA
	Mr Hubert LEVEZIEL	Directeur de Recherche, INRA
	Mme Valérie AMARGER	Chargé de Recherche (CR1), INRA
	Mr Raymond JULIEN	Professeur, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale Sciences Technologies Santé ED 258

Institut des Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 1061 INRA, Génétique Moléculaire Animale

THESE N°32

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Lydie ROUHAUD

Le 23 Novembre 2004

« Organisation, expression et polymorphismes des gènes
ACVR2B et *FST*, intervenant dans la voie de signalisation de la
myostatine (GDF-8). »

Directeur de Thèse : Pr Raymond Julien

Jury :

Rapporteurs :	Mme Roberta CIAMPOLINI	Docteur, Faculté de Médecine Vétérinaire, Pise
	Mr Michel DUCLOS	Chargé de Recherche (CR1), INRA
Examineurs :	Mr Jean-Pierre BIDANEL	Directeur de Recherche, INRA
	Mr Hubert LEVEZIEL	Directeur de Recherche, INRA
	Mme Valérie AMARGER	Chargé de Recherche (CR1), INRA
	Mr Raymond JULIEN	Professeur, Université de Limoges

Remerciements

Je remercie tous les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce manuscrit :

Les rapporteurs, Monsieur Michel DUCLOS et Madame Roberta Ciampolini, que je remercie particulièrement pour les discussions échangées.

Le président, Monsieur Hubert LEVEZIEL

Les membres du jury, Madame Valérie AMARGER, Monsieur Jean-Pierre BIDANEL et Monsieur Raymond JULIEN.

Je remercie Monsieur Raymond Julien pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité Mixte de Recherche de Génétique Moléculaire Animale de l'Université de Limoges, ainsi que Monsieur Hubert Levézuel pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe « Muscles » du laboratoire.

Je remercie sincèrement Valérie pour avoir accepté de « prendre le train en marche », pour sa disponibilité et son soutien quotidiens, son caractère franc et objectif, et pour ses connaissances sur l'étude des polymorphismes et la génétique animale en général. Tes qualités m'ont guidées pour avancer sur ce chemin assez obscur.

Je te remercie tout simplement d'avoir été là... sans quoi... je n'ose imaginer...

Un grand merci également à Bastien pour sa patience... sans quoi sa maman n'aurait pu être là le jour J.

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont soutenue au cours de ces quatre années et qui ont contribué à l'avancée de ce travail par leurs savoirs, leurs idées et leur gentillesse. Merci Marie pour ton aide précieuse au cours des derniers mois. Tu es toujours disponible, tu as toujours la pêche, et ça, c'est très agréable.

Merci aussi à tous les doctorants, les « presque docteurs » et les plus jeunes... Les grandes discussions et les plans sur la comète que nous formulions au cours des pauses clopes et des pauses cafés, m'ont fait le plus grand bien...

Cricri, le mentor de la biologie moléculaire in Limoges, merci pour ton aide, tes conseils avisés, ta disponibilité sans faille, ta bonne humeur, ta musique yéyé et tes blagues à deux francs... Bonne chance pour ta petite entreprise...

Carole, toujours souriante et prête à rendre service, toujours prête à boire un « caf » et à fumer une p'tite clope, même si nos préoccupations étaient assez divergentes, merci pour tout ce que tu m'as apportée et surtout merci de m'avoir permis de te rencontrer...

Sylvain et Michaël, les deux mecs, merci pour votre richesse de connaissances, pour vos conseils techniques, et surtout...pour vos dépannages informatiques dont j'ai abusé et plus encore...Michaël, merci t'avoir pris autant sur ton temps, et Sylvain, merci pour tes mots si doux...

Peggy, je suis fière d'avoir eu une amie telle que toi à mes côtés tout au long de ces quatre années. Tu m'as appris beaucoup de choses, scientifiques et personnelles, et je te suis très reconnaissante pour la patience et le courage dont tu as fait preuve à mon égard...Merci pour tout. Je te souhaite sincèrement toute la réussite et le bonheur que tu mérites pour la suite.

Merci aussi aux petites dernières, Céline et Flo, à qui je souhaite pleins de bonnes choses...

Un grand merci aussi à mon coach sportif qui est devenu mon amie. Merci Loulou pour tous ces moments que l'on a partagé (y compris devant ma porte d'entrée !). Merci pour toutes ces bouffées d'air frais que tu m'as insufflée...

Merci à tous, vous êtes mes limougeauds préférés...

Merci aussi à mes amis poitevins et angoumoisins. Je vous connais depuis bien longtemps, mais ces week-ends partagés sur Limoges resteront mémorables...

Enfin, merci à ma famille et particulièrement à ma petite Maman et à ma petite soeurette. Toutes les deux si je ne vous avais pas...

Et en toute fin, un BIG MERCI à Cédric, qui m'a soutenue, rassurée et qui a su (ou plutôt essayé) prendre sur lui dans les moments difficiles. Merci pour tout tes allers-retours, tes coups de fils...et ton amour.

Liste des abréviations

ActRIIB/ACVR2B: Activin Receptor Type IIB
ADN: Acide Désoxyribonucléique
ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ALK: Activin-like Kinase
ARN: Acide Ribonucléique
BAC: Bacterial Artificial Chromosome
BBB: Bleu Blanc Belge
bHLH: basic Helix loop Helix
BMP: Bone Morphogenetic Protein
CKI: Cyclin Kinase Independent
Cdk: Cyclin dependant kinase
Co-Smad: Co-mediator Smad
EGFP: Enhancer Green Fluorescent Protein
FGF: Fibroblast Growth Factor
FS, FST: Follistatine
FS-I, -II, -III: Domaine Follistatine I, II, III.
GDF: Growth Differentiation Factor
GH: Growth Hormone
IGF: Insulin-like Growth Factor
I-Smad: Inhibitory Smad
Kb: Kilobase
LAP: Latency-Associated Protein
MEF2: Muscle Enhancer Factor 2
mh: muscular hypertrophy
MHC: Myosin Heavy Chain
MRF4: Muscle Regulatory Factor 4
MRE: Metal Response Element
MTF-1: Metal-responsive Transcription Factor-1
MyoD: Myoblast Determination gene
Myf5: Myogenic Factor 5
pb: paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction

QTL: Quantitative Trait Loci

SH3: Src-Homology 3

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

Table des matières

Avant-propos	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	3
Les caractères phénotypiques d'intérêt économique chez les animaux d'élevage.	5
I.1. Gènes et loci identifiés.	5
I.2. Qualités de la viande bovine.	11
I.3. Le caractère « hypermusclé » chez les bovins.	15
I.3.1. Caractéristiques générales.	15
I.3.2. Origine génétique.	19
Structure du muscle squelettique.	23
II.1. Le tissu musculaire strié squelettique.	23
II.2. Les myofibrilles.	23
II.2.1. Structure.	23
II.2.1.1. Les filaments fins d'actine.	25
II.2.1.2. Les filaments épais de myosine.	25
II.2.2. Classification des fibres musculaires.	25
Origine embryonnaire et développement du muscle squelettique.	29
III.1. Origine embryonnaire du muscle squelettique.	29
III.2. Différenciation des myoblastes en myotubes contractiles.	33
III.3. Diversité des fibres musculaires.	35
III.4. Variabilité génétique des fibres musculaires.	37
III.5. Différenciation métabolique des fibres musculaires.	39
Régulation de la myogenèse.	43
IV.1. Les facteurs myogéniques et leurs protéines d'interaction.	43
IV.1.1. Cinétique d'expression.	45
IV.1.2. Redondance de leurs activités myogéniques.	45
IV.1.3. Les protéines d'interaction agonistes et antagonistes.	49
IV.1.3.1. Les protéines activatrices.	49
IV.1.3.2. Les protéines antagonistes.	51
IV.1.4. Cycle cellulaire et facteurs myogéniques.	53
IV.2. Les facteurs de croissance.	55
IV.2.1. Famille des Insuline et Insulin-like Growth Factors (IGFs).	55
IV.2.2. Famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs).	57
IV.2.3. Superfamille des Transforming Growth Factor β (TGF- β s).	59
IV.2.3.1. Les ligands de la superfamille des TGF- β s.	61
IV.2.3.1.1. Famille des TGF- β s.	61
IV.2.3.1.2. Famille des BMPs.	63
IV.2.3.1.3. Famille des Activines.	63
IV.2.3.1.4. La myostatine (GDF-8).	65
IV.2.3.1.4.1. Conservation de la séquence peptidique.	65
IV.2.3.1.4.2. Expression spatio-temporelle, <i>in vivo</i> .	67
IV.2.3.1.4.3. Rôle de la myostatine, <i>in vitro</i> .	67
IV.2.3.1.4.4. La myostatine et les facteurs myogéniques.	69
IV.2.3.1.4.5. La myostatine dans le processus de régénération musculaire.	69
IV.2.3.2. Structure générale des ligands de la superfamille des TGF- β s.	71
IV.2.3.3. Les récepteurs de la famille des TGF- β s.	71
IV.2.3.3.1. Les récepteurs de type II des Activines.	73
IV.2.3.3.1.1. Structure.	73
IV.2.3.3.1.2. Isoformes protéiques.	73
IV.2.3.3.1.3. Mode d'activation.	75
IV.2.3.3.1.4. Expression et fonction du récepteur ActRIIB dans l'embryogenèse.	77
IV.2.3.3.1.5. ActRIIB et la myostatine.	77
IV.2.3.4. Voies de signalisation des membres de la superfamille des TGF- β s.	79

IV.2.3.4.1. Mécanismes de liaison du ligand aux récepteurs.	79
IV.2.3.4.2. Contrôle des interactions ligand/récepteurs.	79
IV.2.3.4.2.1 La follistatine.	81
IV.2.2.4.3. Mécanismes d'activation des récepteurs.	85
IV.2.2.4.4. Voie de signalisation des Smads.	87
IV.2.4. La myostatine et l'hypertrophie musculaire.	89
IV.2.4.1. Expression de la myostatine dans des modèles transgéniques.	89
IV.2.4.2. Mutations spontanées dans le gène codant la myostatine.	91
RESULTATS	99
I. Structures génomiques des gènes <i>ACVR2B</i> et <i>FST</i> bovins.	105
I.1. Le gène <i>ACVR2B</i> bovin.	105
I.2. Le gène <i>FST</i> bovin.	113
II Expression des gènes <i>ACVR2B</i> et <i>FST</i> bovins.	121
II.1. Expression tissulaire du gène <i>ACVR2B</i> .	121
II.2. Expression tissulaire du gène <i>FST</i> .	121
II.2.1. Mécanisme d'épissage du transcrit long.	123
II.2.2 Mécanisme d'épissage du transcrit court.	125
II.2.3. Expression du gène <i>FST</i> .	127
III.1. Identification de polymorphismes dans les gènes <i>ACVR2B</i> et <i>FST</i> .	131
III.1.1. Polymorphismes détectés dans le gène <i>ACVR2B</i> bovin.	131
III.1.2. Polymorphismes détectés dans le gène <i>FST</i> bovin.	133
IV. Analyse fonctionnelle de la région promotrice du gène <i>ACVR2B</i> .	139
DISCUSSION	141
MATERIELS & METHODES	161
Matériel biologique.	163
I.1 Bactéries.	163
I.2 Vecteurs.	163
I.3 ADN génomique.	163
I.4 Tissus	165
Méthodes microbiologiques et génétiques.	167
II.1 Conditions de culture des bactéries.	167
II.2 Transformation par choc thermique de <i>Escherichia coli</i>	169
Méthodes de biologie moléculaire.	171
III.1 Préparation d'ADN.	171
III.1.1 Extraction d'ADN à partir de tissus.	171
III.1.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique de <i>Escherichia coli</i> .	171
III.1.3 Midi-préparation d'ADN plasmidique de <i>Escherichia coli</i> .	173
III.1.4 Midi-préparation d'ADN de BAC.	175
III.1.5 Purification de l'ADN de BAC pour séquençage.	175
III.2 Les enzymes de modification de l'ADN.	177
III.2.1 Les endonucléases de restriction.	177
III.2.2 La phosphatase alcaline.	179
III.2.3 Les <i>Taq</i> DNA polymérases.	179
III.3 Analyse de l'ADN.	181
III.3.1 Migration horizontale en gel d'agarose.	181
III.3.1.1 Gels analytiques.	181
III.3.1.2 Gels préparatifs.	181
III.3.1.2.1 Purification des fragments d'ADN.	183
III.3.2 Analyse informatique de l'ADN.	183
III.4 Synthèse de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).	185
III.4.1 Oligonucléotides.	185

III.4.2 Réaction de PCR (Saiki.et coll., 1988).	185
III.4.3 Amplification de longs fragments d'ADN.	189
III.4.4 Amplification des extrémités 5' promotrices des ADN.	189
III.5 Ligatures.	191
III.5.1 Ligatures de fragments d'ADN à extrémités franches.	191
III.5.2 Ligatures de fragments d'ADN à extrémités cohésives.	193
III.6 Recherche de polymorphismes de type SNP (Single Nucléotide Polymorphism) par la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	193
III.6.1 Préparation des échantillons et des standards.	193
III.6.2 Préparation des gels	195
III.6.3 Electrophorèse	195
III.6.4 Coloration au nitrate d'argent	195
III.7 Analyse génétique des microsatellites	197
III.7.1 Préparation des échantillons :	197
III.7.1.1 Préparations des PCRs :	197
III.7.1.2 Préparation du marqueur de taille :	199
III.7.1.3 Préparation des échantillons pour le génotypage.	199
III.7.2 Analyse bioinformatique des microsatellites.	199
III.8 Hybridation moléculaire sur membrane.	201
III.8.1 Transfert de fragments d'ADN de BAC sur une membrane de nylon (méthode de Southern, 1975)	201
III.8.2 Hybridation de l'ADN avec une sonde ADN radio-marquée.	201
III.8.3 Marquage radioactif des fragments d'ADN par amorçage au hasard.	203
III.9 Techniques relatives aux ARNs.	205
III.9.1 Extraction des ARNs totaux.	205
III.9.2 Réaction de Transcription inverse par RT-PCR	205
III.9.2.1 Synthèse d'ADN complémentaire simple brin	205
III.9.2.2 Réaction de PCR à partir des ADNc synthétisés	207
III.10 Séquençage d'ADN selon la méthode de Sanger et coll., 1977 (analyse par électrophorèse capillaire).	209
Méthodes biochimiques.	213
IV .1 Production et purification de GDF-8 bovine recombinante.	213
IV.1.1 Induction de la production de la protéine recombinante.	213
IV.1.2 Analyse des protéines en gel de polyacrylamide.	213
IV.1.3 Purification de la protéine recombinante.	215
IV.1.3.1 Récupération des corps d'inclusion produits par les bactéries	215
IV.1.3.2 Solubilisation des corps d'inclusion	215
IV.1.3.3 Dosage des protéines : méthode de Bradford (1976).	217
IV.2 Production d'Anticorps polyclonaux.	217
IV.3 Quantification de la protéine recombinante rGDF-8 et titrage des anticorps purifiés par la technique ELISA.	219
Méthodes de biologie cellulaire.	223
V.1 Tansfections transitoires des cellules COS-7 adhérentes	223
V.2 Analyse de l'activité du promoteur par cytométrie en flux.	225
NOUVEAU CHAPITRE DE LA THÈSE	229
Place et enjeux de la thèse	231
Gestion du projet et moyens mis en œuvre	237
Compétences développées dans le cadre du projet	241
Evaluation des retombées de la thèse	243

Table des figures

Figure 1 : Photos de deux bovins mâles « hypermusclés ».....	14
Figure 2 : Représentation schématique du gène codant pour la myostatine et position des mutations associées à l'hypertrophie musculaire chez le bovin.....	18
Figure 3 : Structure macroscopique du muscle squelettique.....	22
Figure 4 : Les sous unité contractiles du muscle squelettique.....	22
Figure 5 : Structure microscopique d'un sarcomère.....	24
Figure 6 : Représentation schématique de la somitogenèse chez les vertébrés.....	28
Figure 7 : Représentation schématique de la formation du muscle squelettique au niveau des membres, chez les Vertébrés.....	30
Figure 8 : Schéma illustrant la séquence des évènements qui caractérisent la différenciation et la maturation des cellules musculaires.....	32
Figure 9 : Mise en place des différents types de fibres musculaires chez le rat.....	34
Figure 10 : Structure schématique du facteur de transcription MyoD.....	42
Figure 11 : Représentation schématique de l'expression des gènes myogéniques de la famille MyoD, au cours du développement musculaire de la souris.....	44
Figure 12 : Expression des facteurs myogéniques de la famille MyoD au cours de la myogenèse.....	44
Figure 13 : Invalidation des facteurs myogéniques chez la souris.....	46
Figure 14 : Représentation schématique de quelques régulateurs positifs et négatifs de MyoD, par des mécanismes d'interaction directe ou indirecte.....	48
Figure 15 : Représentation schématique des interactions possibles entre les ligands de la superfamille des TGF- β s, leurs molécules de liaison, les co-récepteurs et les récepteurs de type I et de type II, chez les Vertébrés.....	58
Figure 16 : Représentation schématique du gène codant pour la myostatine, et de sa structure protéique.....	64
Figure 17 : Inhibition de la prolifération des cellules musculaires par la myostatine.....	66
Figure 18 : Représentation schématique de la biosynthèse de la myostatine.....	70
Figure 19: Représentation schématique des 4 isoformes murines de la protéine ActRIIB.....	72
Figure 20 : Représentation schématique des 2 isoformes bovines de la protéine ActRIIB: bActRIIB2 et bActRIIB5 (par analogie avec les isoformes murines).....	74
Figure 21: Représentation schématique du gène codant la follistatine et des mécanismes d'épissage alternatif et de clivage protéolytique donnant naissance aux formes protéiques majeures.....	80
Figure 22 : Régulation de la voie de signalisation des membres de la superfamille des TGF- β s.....	86
Figure 23: Modèle de signalisation de la myostatine.....	94
Figure 24: Structure génomique et polymorphismes du gène <i>ACVR2B</i> bovin.....	104
Figure 25: Amplifications obtenues par la technique GenomeWalker™ (voir Matériels & Méthodes).....	104
Figure 26: Alignement des séquences humaine, murine et bovine des régions promotrice et 5'UTR du gène <i>ACVR2B</i>	111
Figure 27: Structure génomique et polymorphismes du gène <i>FST</i> bovin.....	112
Figure 28 : Amplifications obtenues par la technique GenomeWalker™ (voir Matériels & Méthodes).....	112
Figure 29: Alignement des régions promotrices des gènes <i>FST</i> humain, bovin, murin et porcine.....	119
Figure 30: Alignement des séquences protéiques du récepteur ActRIIB de la souris, du rat, de l'humain et du bovin.....	120

Figure 31 : Expression du gène <i>ACVR2B</i> par RT-PCR réalisée à partir d'ADNc extraits de différents tissus.....	120
Figure 32 : Positions des deux mécanismes d'épissage alternatif du gène <i>FST</i>	121
Figure 33 : Expression du gène <i>FST</i> bovin obtenue par RT-PCR à partir des ADNc de 13 tissus différents extrait d'un seul individu.	127
Figure 34 : Alignement des séquences protéiques de la forme longue FS-344 de la follistatine du porc, du bovin, de l'humain, de la souris et du rat.	128
Figure 35 : Transcrits alternatifs du gène <i>FST</i>	129
Figure 36: Variabilité des allèles du microsatellite localisé dans le promoteur du gène <i>FST</i> bovin.....	132
Figure 37 : Variabilité des allèles du microsatellite localisé dans l'intron 1 du gène <i>FST</i> bovin.	136
Figure 38 : Analyse de l'expression transitoire du promoteur du gène <i>ACVR2B</i> bovin.....	138
Figure 39 : Photos de bovins de la race Bazadaise.	164
Figure 40 : Principe de la technique GenomeWalker™.....	188
Figure 41: Carte du vecteur pGEM®-T Easy (Promega).....	190
Figure 42: Protocole d'immunisation des lapins (AGRO-BIO), pour la production d'anticorps anti-myostatine bovine.	216
Figure 43: Carte du vecteur pEGFP-1 (Clontech).....	222

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de gènes ou loci identifiés dans quatre espèces d'élevage.	4
Tableau 2 : Mutations détectées dans le gène codant pour la myostatine et responsables du phénotype «hypermusclé » dans plusieurs races bovines.	18
Tableau 3 : Les isoformes de chaînes lourdes de myosine dans le muscle squelettique des mammifères.	24
Tableau 4 : Caractéristiques des fibres lentes (I) et des fibres rapides (II).	26
Tableau 5 : Protéines « homeobox » impliquées dans la formation des muscles des membres avant le démarrage de la myogenèse.	30
Tableau 6 : Facteurs de régulation de la formation des myofibrilles au cours du développement embryonnaire.	54
Tableau 7: Tableau récapitulatif des mutations connues dans la séquence du gène codant la myostatine, responsables d'une augmentation de la masse musculaire chez le bovin, la souris et l'homme.	90
Tableau 8: Génotypes des 12 individus de race Bazadaise, établis à partir des différents polymorphismes détectés dans la séquence du gène <i>ACVR2B</i>	130
Tableau 9: Résultat du séquençage de la région 5' du gène <i>ACVR2B</i> chez 21 individus de race bovine Bazadaise, Angus, Charolaise et Limousine.	130
Tableau 10: Génotypes des 12 individus de race Bazadaise, établis à partir des différents polymorphismes détectés dans la séquence du gène <i>FST</i>	132
Tableau 11: Fréquence allélique des différents allèles du microsatellite situé dans la région promotrice du gène <i>FST</i> bovin.	135
Tableau 12: Fréquence allélique des différents allèles du microsatellite situé dans l'intron 1 du gène <i>FST</i> bovin.	136
Tableau 13: Liste des ADNg bovins typés pour le gène codant la myostatine (GDF-8).	163
Tableau 14: Séquences et positions des oligonucléotides utilisés.	184
Tableau 15: Caractéristiques des marqueurs fluorescents des didésoxynucléotides.	208

Avant-propos

La croissance musculaire et les qualités sensorielles de la viande (la couleur, la flaveur, la jutosité et la tendreté) des animaux d'élevage sont régulées par deux composantes d'égale importance, les facteurs environnementaux et le patrimoine génétique. L'intérêt croissant pour rechercher des méthodes permettant de mieux maîtriser la composante génétique (sélection assistée par marqueurs ou encore développement de la génomique fonctionnelle), révèle l'importance des enjeux économiques liés à la sélection. Chez le bovin, de nombreuses démarches sont engagées en vue d'élucider les mécanismes de régulation du développement musculaire, de mieux les maîtriser et de contrôler, finalement, la qualité de la viande. Les bovins dits « hypermusclés » sont à cet égard, des modèles d'étude « économiquement » intéressants puisqu'ils présentent une augmentation de leur masse musculaire tout en conservant une viande aux propriétés organoleptiques jugées parfois favorables.

Un gène majeur responsable de cette hypertrophie musculaire a été identifié en 1997 (McPherron *et al.*, 1997), suite aux résultats obtenus après invalidation de ce gène chez la souris, qui présentait une incroyable augmentation de la masse musculaire. Il code pour un inhibiteur de la croissance musculaire, la myostatine ou GDF-8 (Growth Differentiation Factor-8), appartenant à la superfamille des TGF- β s. Chez le bovin, plusieurs mutations conduisant à la synthèse d'une protéine inactive ont également été découvertes dans ce gène (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron and Lee, 1997) et associées à l'hypertrophie musculaire observée dans certaines races. Cependant, certains animaux présentent une forte musculature sans qu'aucune des mutations fonctionnelles connues dans le gène codant pour la myostatine ne soit présente (Grobet *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 1998). L'acquisition de ce trait phénotypique, pourrait alors être associée, à d'autres mutations non encore détectées dans la séquence génomique du gène, mais pourrait également être associée à d'autres gènes, codant, par exemple, pour les partenaires protéiques de la voie de signalisation de la myostatine. Quelques acteurs (McPherron *et al.*, 1997) de cette voie étant identifiés au début de ma thèse, l'objectif de ce travail a été de rechercher des polymorphismes dans la séquence génomique de deux gènes candidats, pouvant être responsables d'une perte de fonctionnalité des protéines correspondantes, ou d'un défaut de régulation de l'expression de ces deux gènes. Ainsi, les éventuelles mutations dans ces deux

gènes pourraient être reliées à un dysfonctionnement des voies de régulation ou d'action de la myostatine, et être à l'origine de certains des phénotypes de musculature extrême.

Les deux gènes candidats choisis codent pour des protéines situées en amont de la cascade de signalisation de la myostatine. Le gène *ACVR2B* (Activin Receptor type 2B) code pour la sous unité II du récepteur de la myostatine (Lee and McPherron, 2001; Rebbapragada *et al.*, 2003), ActRIIB. Le gène *FST* code la follistatine, une protéine qui se complexe avec la myostatine circulante pour la maintenir dans un état inactif et régule sa fixation sur son récepteur.

Ce manuscrit est organisé en trois parties :

Partie 1 : une étude bibliographique décrivant les caractères phénotypiques d'intérêt économique chez les animaux d'élevage, l'ontogenèse du muscle squelettique et les différents facteurs régulant sa mise en place.

Partie 2 : les résultats, présentés sous la forme d'un article, auxquels sont annexés des résultats complémentaires.

Partie 3 : une discussion portant sur les résultats obtenus et les perspectives d'étude.

Introduction

Bibliographique

Espèces	Trait phénotypique	Locus	Gène
Poulet	Coloration du plumage Nanisme	extension	MC1R GHR
Mouton	Coloration de la robe Taux d'ovulation, fertilité		MC1R BMP15, BMPR1B, Boorola
	Hypertrophie musculaire	CLPG	
Porc	Coloration de la robe Couleur blanche dominante* Hyperthermie maligne* Taux de glycogène dans les muscles squelettiques* Hypertrophie musculaire	KIT Halothane	MC1R RYR1 PRKAG3 IGF2
Bovin	Coloration de la robe	extension	MCR1 Silver/PMEL17
	Hypertrophie musculaire Production laitière	mh DGAT	GDF-8

Tableau 1 : Exemples de gènes ou loci identifiés dans quatre espèces d'élevage.

Les * indiquent que ces traits phénotypiques sont également associés à une hypertrophie musculaire.

(D'après Andersson, 2004).

Les caractères phénotypiques d'intérêt économique chez les animaux d'élevage.

Les animaux domestiques sont depuis bien longtemps élevés et améliorés pour des caractères jugés favorables à divers titres. Ces traits phénotypiques sont liés à des mutations qui se sont accumulées au fil des ans et qui ont été sélectionnées par les différents modes d'élevage. Ces caractéristiques peuvent être monogéniques, mais dans la plupart des cas ce sont des caractères complexes multifactoriels. L'identification de mutations liées à des phénotypes intéressants, a déjà illustré le potentiel des animaux domestiques à réunir une multitude de gènes responsables de la diversité phénotypique. De plus, les grandes différences rencontrées dans chaque race associées à une variation génétique limitée, font des animaux d'élevage des modèles d'étude intéressants. Leurs génomes présentent un intérêt particulier pour le déterminisme de certains caractères génétiques multifactoriels comme le développement, la croissance, le métabolisme énergétique, la reproduction ou encore le comportement. L'identification des mutations responsables et l'élucidation de leur mécanisme d'action, sont et seront très importants pour la compréhension des phénomènes physiologiques régissant ces caractères phénotypiques complexes (Andersson and Georges, 2004).

I.1. Gènes et loci identifiés.

L'étude du génome des espèces domestiques, outre les applications au domaine médical et son importance dans la recherche fondamentale, a pour but d'améliorer les performances qualitatives et quantitatives de la production agricole. Les premiers caractères sélectionnés furent certainement la robustesse, la croissance, les aptitudes bouchères et laitières ou encore la fertilité. Ce dernier caractère est très important mais néanmoins difficile à étudier à cause d'une héritabilité faible au regard des facteurs environnementaux comme la santé ou les habitudes nutritives qui sont prépondérantes. Cependant, après le gène *Boorola*, deux allèles différents situés au locus *Inverdale* lié au chromosome X semblent affecter le taux d'ovulation chez le mouton. Une mutation dans le gène *BMP15* qui code pour un facteur de croissance de l'oocyte a été identifiée, et les animaux homozygotes ont un taux d'ovulation élevé alors que les individus hétérozygotes sont stériles (Andersson, 2001).

Chez le porc, plusieurs QTLs associés à ces caractères reproductifs ont été identifiés grâce à des croisements de races différentes et à l'observation de leur descendance.

La coloration de la robe, très diversifiée par rapport à ce qui est observé dans les populations naturelles, est aussi sélectionnée depuis longtemps, car elle identifie spécifiquement chaque race. Le gène *Mclr* (Melanocortin receptor 1), responsable de la distribution des pigments rouges et noirs, a été identifié dans sept espèces d'élevage (Andersson, 2001). Ce trait phénotypique est d'autant plus intéressant qu'il est lié à la reproduction des animaux. Chez le porc, la couleur blanche dominante est due à des mutations au locus *KIT*, qui code pour un récepteur de facteur de croissance des cellules souches. Deux mutations conduisent à l'existence de trois allèles différents, l'allèle sauvage, caractérisé par un phénotype noir, l'allèle *Dominant white* responsable de l'absence totale de pigmentation, et l'allèle *Patch*, provoquant l'apparition de tâches noires (Andersson, 2001). Dernièrement, lors de travaux sur les gènes *Silver/PMEL17*, dont le produit joue un rôle déterminant dans la synthèse des pigments chez les mammifères, un polymorphisme vient d'être identifié dans la race bovine Charolaise. Tous les animaux sont homozygotes pour l'allèle récessif, dont l'effet est une dilution de la coloration de la robe. Ainsi, tout croisement réalisé avec un individu de race Charolaise, si/si, provoquera une dilution de la coloration de la robe dans la descendance (Tableau 1).

Cependant, la sélection basée sur la composition corporelle des animaux d'élevage, reste la plus exploitée par les producteurs et les industriels. Particulièrement le rapport muscle/tissu adipeux est très important dans la production bouchère des animaux, et depuis plusieurs années, une sélection accrue au sein de différentes espèces a été entreprise pour la production de viande maigre. Les mutations liées à ce caractère ont souvent été associées à une augmentation de la masse musculaire des animaux domestiques, et pour certaines d'entre elles, le gène ou le QTL (Quantitative Trait Loci) responsable est maintenant clairement identifié.

Le premier caractérisé à l'échelle moléculaire, est le locus *Halothane* chez le porc (Fujii *et al.*, 1991). Une mutation ponctuelle (R614C) a été localisée dans cette région, précisément au niveau du gène *RYR1* (Ryanodine Receptor1), qui code pour un canal calcique spécifique du muscle squelettique. Cette mutation récessive, associée à une augmentation de la masse de viande maigre chez les animaux homozygotes atteints, entraîne cependant une susceptibilité à l'hyperthermie maligne qui peut être activée par le stress ou par le gaz

anesthésique halothane. La mutation ponctuelle RN-, détectée dans le gène *PRKAG3* qui code la sous unité régulatrice $\gamma 3$ de l'AMPK (AMP dependant Protein Kinase), provoque aussi une augmentation de la masse musculaire dans certaines races porcines, comme la race Hampshire (Milan *et al.*, 2000). Cette mutation ponctuelle (R200Q) s'accompagne cependant d'une diminution du pH de la viande due à la dégradation *post-mortem* du glycogène musculaire qui est augmenté de 70%, et d'une perte en eau à la cuisson. Ce caractère fut donc rapidement jugé néfaste par les producteurs car il entraîne à la fois une baisse de qualité et de rendement lors de l'élaboration de jambon cuit. Cependant, les effets phénotypiques très distincts engendrés par cette mutation sur la viande de porc, ont pu mettre en évidence sur un plan moléculaire le rôle important de l'AMPK dans le métabolisme énergétique du muscle squelettique. Enfin, un troisième locus affectant le développement musculaire et la composition corporelle du porc a récemment été identifié. Il s'agit d'un QTL lié au gène *IGF2* (Insulin-like Growth Factor 2), ou plus exactement d'un QTN (Quantitative Trait Nucleotide) puisque la mutation à l'origine de ce phénotype est la substitution d'une seule base située dans l'intron 3 (Van Laere *et al.*, 2003). Cette mutation ponctuelle (G3072A), localisée dans une région CpG très conservée, empêche l'interaction avec un facteur nucléaire, *in vitro*, ce qui, par conséquent, altère la régulation du gène *IGF2* et provoque une augmentation du taux de transcription des ARNm musculaires d'un facteur trois. Les animaux atteints, qui héritent ce génotype de leur père, sont caractérisés par une forte musculature et une diminution des dépôts adipeux. Ces traits phénotypiques ne se manifestent qu'après la naissance (Andersson and Georges, 2004).

Chez les ovins, le locus callipyge (*CLPG*), associé à une hypertrophie musculaire, a été localisé sur le chromosome 18 en 1983. La mutation responsable, récemment identifiée, (Freking *et al.*, 2002; Smit *et al.*, 2003) est la substitution d'un nucléotide [A→G] dans une région dite LRCE (Long-Range Control Element), qui joue un rôle important dans la régulation de certains gènes situés à proximité. Ce phénotype, caractérisé par une augmentation de la masse musculaire de l'arrière train due à une augmentation du nombre et du diamètre des fibres musculaires rapides, apparaît naturellement chez les animaux âgés de trois à quatre semaines. Il ne s'exprime que chez les individus hétérozygotes qui ont reçu l'allèle de leur père, ce qui suggère que la régulation de ce locus est soumise à une empreinte parentale. On parle de « surdominance polaire » (Georges *et al.*, 2003). Ce mode héréditaire particulier soumis à une empreinte génétique et affectant la composition corporelle semble être le même phénomène que celui observé au locus *IGF2* chez le porc

Enfin, plusieurs races bovines, dont les races Blanc Bleu Belge, Charolaise et Piémontaise, ont développé une hypertrophie musculaire, suite à ces sélections intensives basées sur l'amélioration de la composition corporelle et l'augmentation de la masse musculaire. Le phénotype obtenu « hypermusclé » est contrôlé par une mutation récessive située au niveau du locus *mh* (muscular hypertrophy) sur le chromosome 2 (Charlier *et al.*, 1995), et auquel a été associé le gène de la myostatine. Ce gène a en fait été clairement identifié quand des souris dont le gène codant la myostatine a été invalidé, ont développé une musculature extrême (McPherron *et al.*, 1997). Chez le bovin, cinq allèles différents ont été détectés par Grobet *et al.* (1998) et associés à cette musculature extrême, qui ne se développe qu'au niveau des muscles superficiels. Bien que cette musculature soit issue d'une sélection intensive, aucun allèle de ce type n'a été retrouvé chez le porc, qui lui aussi a fait l'objet d'une forte pression de sélection pour ce caractère (Andersson, 2001).

Parmi ces traits phénotypiques largement étudiés et sélectionnés, un autre, beaucoup plus suggestif, est la qualité de la viande. C'est un caractère complexe, multifactoriel, faisant intervenir une composante structurale et une composante métabolique, toutes les deux liées au patrimoine génétique et à l'alimentation. Dans le cadre de notre thématique de recherche, cette notion sera plus approfondie et limitée à la race bovine.

1.2. Qualités de la viande bovine.

De nombreux paramètres physiques, biochimiques ou encore gustatifs sont connus et considérés pour estimer la qualité d'une viande. Cependant cette appréciation est encore basée dans la plupart des études, sur l'observation des caractères phénotypiques des animaux sans nécessité de prélèvements invasifs après l'abattage, qui engendrent des coûts importants et surtout une forte dépréciation de la valeur marchande des carcasses. Plusieurs instituts internationaux de recherche agronomique comme l'INRA ou l'USDA, mettent alors en place des protocoles d'élevage permettant d'associer mesures phénotypiques, qualité de la viande et recherche de QTLs. De nombreuses recherches de données génétiques sont ainsi entreprises, en essayant de prendre en compte trois paramètres importants : l'amélioration de la précision des techniques de mesures, leur coût, et surtout leur reproductibilité (Smith, T. P. L. *et al.*, 2003).

Actuellement, quelques méthodes ayant trait aux principales mesures de qualité existent et permettent d'obtenir les premières valeurs expérimentales. Les deux principaux critères de qualité de la viande bovine sont la tendreté et l'indice de persillage. La tendreté

résulte de la protéolyse *post-mortem* ménagée des fibres musculaires, et dépend de l'action d'enzymes pendant la maturation de la viande après l'abattage. Elle présente une forte variabilité d'une race à l'autre, d'un individu à l'autre et même d'un muscle à l'autre. Elle peut être évaluée selon deux principes. D'une part, par analyse sensorielle, méthode délicate à mettre en œuvre et assez subjective, mais cependant proche de l'appréciation des consommateurs. D'autre part, par des méthodes de mesures physiques comme la force de cisaillement de Warner-Bratzler, liée à l'état de protéolyse mais aussi à la teneur en collagène. Cette méthode est aujourd'hui la plus couramment utilisée car c'est une méthode très reproductible et qui tend à être de plus en plus standardisée entre les différents laboratoires (Smith, T. P. L. *et al.*, 2003). Le deuxième critère de qualité est l'indice de persillage. Il est déterminé par la quantité et la distribution des lipides intramusculaires, et sera garant du goût. En effet, une viande avec un fort taux de gras intramusculaire sera perçue comme plus tendre et plus juteuse. L'appréciation de ce critère reste très différent d'un pays à l'autre et est directement lié aux préférences gustatives des consommateurs. C'est pourquoi il reste très difficile à évaluer et à introduire dans les critères de sélection et d'élevage, même si, Renand *et al.*, (2003) ont montré qu'une sélection sur un indice combinant la croissance et l'efficacité alimentaire permettait d'améliorer la croissance musculaire sans modifier celle des dépôts adipeux. En effet, le rapport muscle/gras qui est une garantie de la saveur de la viande, est aussi un paramètre majeur en terme de croissance. De manière moins directe, l'épaisseur de gras sous-cutané est aussi liée à la qualité de la viande, car elle influence la maturation (Dufey and Chambaz, 1999) liée au métabolisme énergétique musculaire.

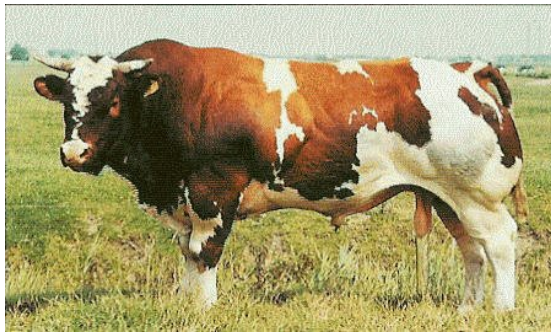


Figure 1 : Photos de deux bovins mâles « hypermusclés ».

A gauche, il s'agit d'un bovin de la race Maine Anjou et à droite, d'un bovin de la race Bleu Blanc Belge (BBB). Les muscles hypertrophiés sont superficiels et situés essentiellement au niveau des épaules, des bras, de la croupe, des cuisses, des fesses et du dos (Clinquart *et al.*, 1998).

I.3. Le caractère « hypermusclé » chez les bovins.

Ce phénotype, décrit pour la première fois par Culley en 1807 (Figure 1), apparaît sporadiquement dans beaucoup de troupeaux à travers le monde et caractérise des animaux avec une musculature hypertrophiée. La race où cette entité a été la plus étudiée est la race bleue de Belgique ou Bleu Blanc Belge (BBB). Dans cette race une sélection très sévère a été réalisée sur la base de performances zootechniques et de la composition de la carcasse (Clinquart *et al.*, 1998). D'autres races telles que la Piémontaise ou la Charolaise présentent ce fort développement musculaire.

I.3.1. Caractéristiques générales.

Ces animaux sont caractérisés par une augmentation de 20% de leur masse musculaire, essentiellement les muscles superficiels des épaules, des bras, de la croupe, des fesses, des cuisses et du dos, alors que la taille de certains organes et du squelette est réduite (Hanset, 1992; Hanset and Ansey, 1972). Cette hypertrophie musculaire associée à une hypotrophie des organes a pour conséquence une augmentation du rendement à l'abattage de ces animaux et une proportion très élevée dans la carcasse, de morceaux de viande à cuisson rapide, donc tendre. De plus, ces animaux présentent une efficacité alimentaire considérablement améliorée, avec un gain de poids différent de celui des sujets mixtes, caractérisé par une augmentation du dépôt en protéines et une diminution du dépôt graisseux (Clinquart *et al.*, 1998). En effet, si la teneur en protéines brutes est supérieure chez ces animaux, la teneur en lipides sous-cutané et intramusculaire est diminuée d'environ 50%, avec néanmoins une proportion en acides gras polyinsaturés supérieure ce qui est un avantage nutritionnel pour le consommateur. En fait ces animaux n'engraissent pas et ont un bon ratio de conversion des aliments ingérés en muscles, ce qui se traduit par une meilleure production de viande de qualité (Casas *et al.*, 1999). Ces modifications de la composition de la carcasse et de la viande peuvent être reliées, en partie, à des différences métaboliques, elles-mêmes reliées à des différences endocriniennes. En effet, les modifications des métabolismes protéique et lipidique observées, sont associées chez ces animaux, à des concentrations élevées de l'hormone de croissance (GH) et à une insulïnémie faible (Clinquart *et al.*, 1998). Enfin, d'autres composantes sont également modifiées, comme la quantité de tissu conjonctif, mesurée par le taux d'hydroxyproline, qui diminue et la coloration de la viande qui devient plus claire, à cause d'une teneur en myoglobine inférieure et d'une diminution de la

proportion des fibres musculaires de type oxydatif chez les animaux « hypermusclés ». La teneur en collagène chute aussi de 40% environ, ce collagène étant plus soluble (Renand *et al.*, 2003), et l'évolution du pH *post-mortem* après l'abattage est modifiée : il diminue plus rapidement. Cette viande plus tendre, mûre donc plus vite, et peut ainsi être mise à la disposition du consommateur en un temps plus court. En bref, le coefficient de production de ces animaux par rapport aux sujets mixtes est nettement amélioré, avec une valorisation exceptionnelle de leurs viandes en boucherie due à une augmentation des morceaux nobles dans la carcasse, et surtout une amélioration de la tendreté de leurs viandes.

Cependant, l'appréciation de ce caractère diverge selon les populations, car d'un point de vue gustatif, toutes ces caractéristiques tendent vers une amélioration de la tendreté (Monin, 1991) mais inversement vers une perte de saveur (Bailey *et al.*, 1982). D'autres inconvénients en ont limité la sélection et la commercialisation. Ces animaux présentent des problèmes respiratoires et les femelles voient leur production de lait et leur fertilité diminuées, et surtout rencontrent des problèmes de vêlage très importants souvent accompagnés de la perte de la mère ou du veau (Clinquart *et al.*, 1998; Hanset, 1992). La procréation de veaux croisés hétérozygotes pour le gène *mh* évite cependant ces inconvénients, tout en produisant des individus qui n'extériorisent pas le caractère mais qui ont une capacité de croissance musculaire supérieure à celle des veaux non croisés non porteur d'un allèle *mh*. Néanmoins, certains pays comme la Belgique ou les Etats-Unis, apprécient de loin les qualités de cette viande et de nombreuses études concernant l'amélioration des performances de ces bovins « hypermusclés » sont réalisées. La production de viande en Belgique est largement basée sur les taureaux culards de la race BBB, même si la production de viande provenant des vaches sélectionnées est en constante croissance. De nombreux programmes d'études sont maintenant mis en place pour comparer les qualités de la viande entre femelles et taureaux « hypermusclés » (Fiems *et al.*, 2002).

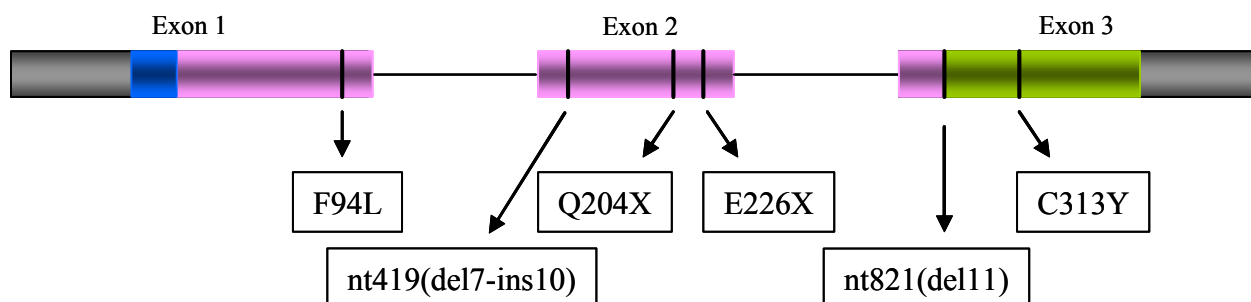


Figure 2 : Représentation schématique du gène codant pour la myostatine et position des mutations associées à l'hypertrophie musculaire chez le bovin.

Le gène codant pour la myostatine est constitué de trois exons. Les parties bleue, rose et verte correspondent aux séquences codant pour le peptide signal, le pro-peptide et le domaine bioactif de la protéine, respectivement. Les mutations sont représentées par un trait noir sur le gène, et leurs positions exactes sont dans les cadres noirs. (D'après Grobet *et al.*, 1998).

Race	mutation	Type de mutation	phénotype
Bleu Blanc Belge	nt821(del11)	perte-de-fonction	« hypermusclé »
Piémontaise	C313Y	perte-de-fonction	« hypermusclé »
Maine Anjou	E226X	perte-de-fonction	« hypermusclé »
Charolaise	Q204X	perte-de-fonction	« hypermusclé »
	nt419(del-ins10)	perte-de-fonction	« hypermusclé »
Limousine	F94L	conservative	non « hypermusclé »

Tableau 2 : Mutations détectées dans le gène codant pour la myostatine et responsables du phénotype « hypermusclé » dans plusieurs races bovines.

Les animaux « hypermusclés » sont soit homozygotes pour une de ces mutations, à l'exception de la mutation F94L, soit hétérozygotes pour deux mutations distinctes.

1.3.2. Origine génétique.

Bien que la nature de l'hérédité de ce caractère fût très tôt reconnue, son mode de transmission a longtemps été controversé. Certains le disaient récessif, d'autres au contraire parlaient de gène dominant voir partiellement récessif (Arthur, 1995; Ménissier, 1982). Les analyses de liaison génétique dans des pédigrés expérimentaux ont suggéré un mode de transmission autosomal et récessif (Hanset and Michaux, 1985a; 1985b), et ceci a été confirmé quand le locus *mh* a été localisé à l'extrémité centromérique du chromosome 2 bovin. Charlier *et al.* (1995) ont en effet mis en évidence l'existence d'un gène autosomal majeur unique.

Depuis lors, 7 polymorphismes dans la séquence codante du gène de la myostatine ont été détectés (Grobet *et al.*, 1997), dont 5 provoquent l'apparition d'une protéine inactive. Ces mutations ont toutes été associées à différentes races bovines (Figure 2; Tableau 2), et les bovins « hypermusclés » sont soit homozygotes (*mh/mh*) pour ces mutations dites « perte-de-fonction » soit hétérozygotes pour deux mutations distinctes (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron and Lee, 1997). Plus récemment, deux polymorphismes supplémentaires ont été détectés dans la région promotrice de ce gène (Crisa *et al.*, 2003), sans qu'aucune association directe n'ait pu être établie avec le phénotype « hypermusclé », à l'exception de la race Marchigiana, uniquement lorsqu'une des mutations « perte-de-fonction » est également présente. De plus, certaines races, telle que la Maine Anjou, présentent une forte hétérogénéité allélique alors que d'autres semblent très homogènes génétiquement (BBB). Ce nombre important d'allèles pourrait refléter un fort degré de mutation dans le gène codant la myostatine mais Grobet *et al.* (1997) pensent que cela résulte plutôt de la longue sélection des animaux. Cette sélection aurait favorisée de telles mutations et les aurait maintenues dans les populations.

Dans la race BBB, le développement musculaire des individus hétérozygotes nt821(del Δ 11)/+ est supérieur à celui des individus +/+. Cette tendance a été confirmée par des mesures sur le poids et la carcasse de souris dont le gène codant la myostatine a été invalidé (McPherron *et al.*, 1997). Ces observations font émettre l'hypothèse qu'une plus faible expression du phénotype « hypermusclé » chez les individus hétérozygotes aurait préférentiellement augmenté la sélection des différents allèles « perte-de-fonction » (Grobet *et al.*, 1997). Ceci expliquerait leur haute fréquence d'apparition dans certaines populations.

La qualité de la viande bovine est un caractère phénotypique d'intérêt économique grandissant. C'est pourquoi, les recherches actuelles visent à mettre en évidence des relations génétiques entre les caractéristiques de production et les qualités sensorielles difficilement mesurables. Ce trait phénotypique a une part environnementale importante, liée au mode d'alimentation et d'élevage de l'animal, mais possède aussi une part génétique, liée à la race, qui conditionnera le développement des muscles squelettiques et, en partie, les caractéristiques biochimiques de chaque muscle. Le temps de maturation d'une viande après l'abattage est liée au métabolisme musculaire oxydatif ou glycolytique, et donc à sa tendreté. Cependant, ce caractère est indissociable du développement et de la croissance du tissu musculaire squelettique, pour définir la qualité d'une viande. En effet, l'expression spatio-temporelle des facteurs myogéniques, des facteurs de croissance, le type de fibres constituant un muscle et leur quantité, sont des paramètres dépendant du patrimoine génétique de chaque individu. Ils sont indispensables pour l'induction et la mise en place du tissu musculaire, pendant le développement embryonnaire, et seront donc les précurseurs de la qualité de la viande bovine.

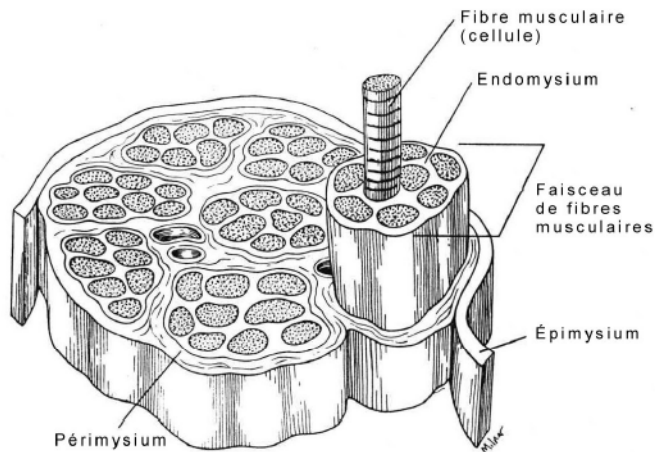


Figure 3 : Structure macroscopique du muscle squelettique.

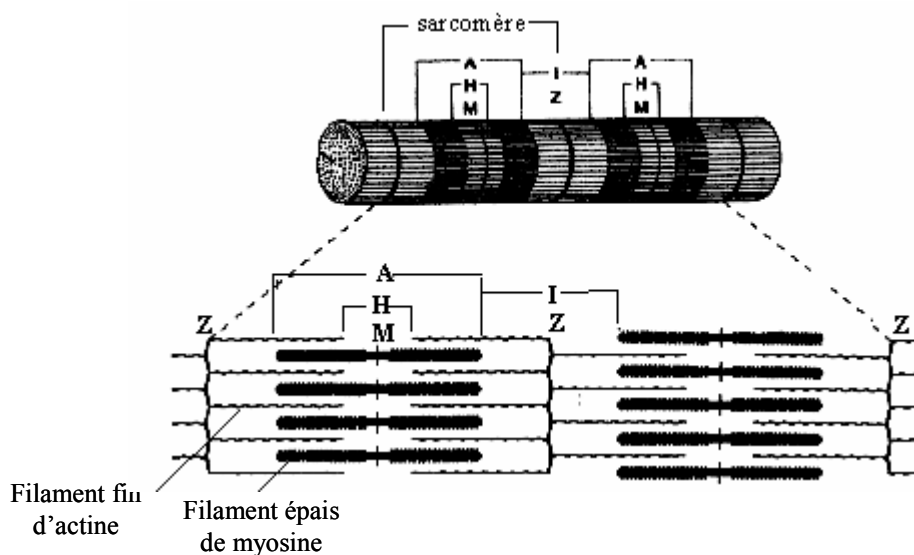


Figure 4 : Les sous-unités contractiles du muscle squelettique.

Le sarcomère, situé entre 2 stries Z, constitue la sous-unité contractile du muscle squelettique. Il est composé de myofilaments fins et épais. Les filaments épais, essentiellement constitués de myosine, sont fixés sur la strie M et disposés de façon parallèle. Les filaments fins, surtout formés d'actine se réunissent au niveau de la strie Z. Au niveau des bandes I et H, les filaments fins et épais ne se chevauchent pas. La disposition au même niveau des bandes A, I et Z sur les fibres adjacentes donne au muscle un aspect strié. Lors de la contraction, les filaments fins glissent sur les filaments épais entraînant un raccourcissement des bandes H et I sans modification de la longueur de la bande A. M: strie M; A: bande anisotrope; I: bande isotrope; H: Bande H; Z: Strie Z; rs: réticulum sarcoplasmique (D'après Harvey & Marshall, 2000).

Structure du muscle squelettique.

II.1. Le tissu musculaire strié squelettique.

Le muscle squelettique est constitué de fibres musculaires, de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins, de neurofibres et d'adipocytes. L'ensemble du muscle est recouvert d'une gaine de tissu conjonctif lâche, l'épimysium. À l'intérieur de cette couche sont disposées les fibres musculaires réunies en faisceaux qui sont eux délimités par le péri-mysium. Cette enveloppe de tissu conjonctif contient des vaisseaux sanguins nécessaires à l'irrigation du muscle. À l'intérieur de chaque faisceau, chaque fibre musculaire est entourée d'une autre couche de tissu conjonctif lâche appelée endomysium (Figure 3).

Les fibres musculaires sont des cellules cylindriques allongées, plurinucléées, dont les noyaux sont situés en périphérie de la cellule, contre la membrane plasmique, ou sarcolemme, qui est entourée d'une membrane basale. Son sarcoplasme contient les organites cellulaires habituels, mais se caractérise surtout par la présence d'un matériel protéique fibrillaire contractile, organisé de façon spécifique en myofibrilles.

II.2. Les myofibrilles.

II.2.1. Structure.

Les myofibrilles sont des structures cylindriques parallèles, allongées dans le sens de la cellule. Ce sont des structures complexes composées de groupes de filaments qui constituent l'élément contractile. Chacune d'entre elles possède plusieurs unités contractiles, les sarcomères (Figure 4). Ceux-ci sont constitués de plusieurs myofilaments minces d'actine et de myofilaments épais de myosine, dont l'agencement donne naissance à différents types de stries et de bandes. En présence d'ATP et de calcium, le glissement des filaments d'actine le long des filaments de myosine permet le raccourcissement et l'allongement du muscle nécessaires à une contraction musculaire complète.

Constituants du sarcomère

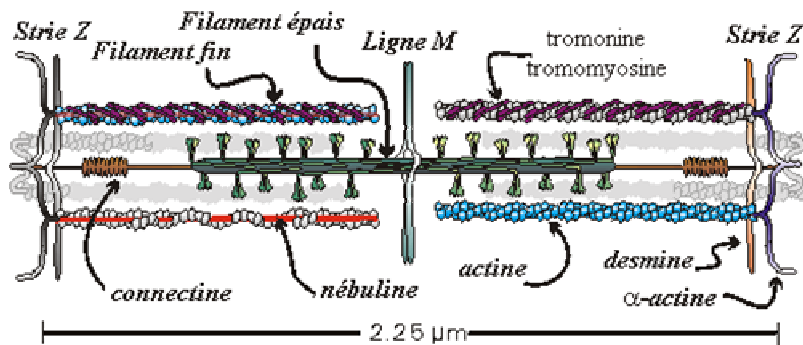


Figure 5 : Structure microscopique d'un sarcomère.

	Isoformes de chaîne lourde	Expression
Développementales	Fœtale ou néonatale Embryonnaire	Stades fœtaux et périnataux
Lentes	MHC I MHC I α MHC ICton MHC Ia	Fibres de type I Stade fœtal chez le bovin et néo-natal chez le porc Muscles extra oculaires Muscles Plantaris chez le rat
Rapides	MHC IIa MHC IIb MHC IIx (II d) MHC II eom MHC IIm MHC II	Fibres de type IIA Fibres de type IIB Fibres de type IIX Muscles extra oculaires Muscles de la mâchoire chez les carnivores Muscles thyroaryténoïdes du larynx chez le rat

Tableau 3 : Les isoformes de chaînes lourdes de myosine dans le muscle squelettique des mammifères.

MHC : Myosin Heavy Chain.

II.2.1.1. Les filaments fins d'actine.

L'actine est une molécule polypeptidique de forme globulaire. La polymérisation des monomères d'actine se fait sous une forme filamentaire. Les polymères d'actine s'accroissent par deux pour former une longue double hélice (Figure 5). Les myofilaments fins sont formés de l'association de cette double hélice d'actine et de deux protéines régulatrices : la tropomyosine, dimère filamenteux rigide de renforcement, et la troponine, complexe de trois sous unités polypeptidiques disposées à intervalles réguliers, le long des filaments d'actine en regard de chaque tête de myosine, et impliqués dans la régulation de la contraction musculaire par le calcium. La nébuline, qui est associée à chaque filament fin du muscle strié squelettique, est supposée déterminer la longueur du filament fin en réalisant un guide pour la polymérisation de l'actine (Figure 5).

II.2.1.2. Les filaments épais de myosine.

Chaque molécule de myosine est formée de deux chaînes lourdes (MHC, *Myosin Heavy Chain*) identiques et de deux paires de chaînes légères (MHL, *Myosin Light Chain*). Il existe de nombreuses isoformes des chaînes lourdes de la myosine : elles sont exprimées à différents temps de la myogenèse et rendent compte du caractère plus ou moins rapide de la contraction des différents types de fibres musculaires. Les deux chaînes lourdes de la myosine sont identiques et accolées l'une à l'autre. Leur longue queue forme un axe torsadé et leur pôle globulaire émerge du filament épais sous la forme d'une tête double. La partie distale, appelé domaine moteur, possède une poche de fixation de l'ATP et un site d'interaction avec l'actine. La tête de myosine possède une activité ATPasique qui s'accroît au contact de l'actine (activité ATPasique actine dépendante). Les deux paires de chaînes légères sont situées à la base des têtes de myosine. La connectine (ou titine) est une protéine qui, dans chaque demi-sarcomère, relie chaque filament épais à la strie Z (Figure 5). Composant élastique, elle maintient l'alignement des filaments épais et oppose une résistance à l'étirement excessif du sarcomère.

II.2.2. Classification des fibres musculaires.

Plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine, issues d'une famille multigénique, sont exprimées au cours du développement des mammifères (Tableau 3) :

Type de fibre	MHC	Activité ATPasique	Métabolisme	Vitesse de contraction
Lente I	I	Faible	Oxydatif	Lente
Rapide IIA	Ila			
Rapide IIX	IIX	Forte	Glycolytique	Rapide
IIB	Ilb			

Tableau 4 : Caractéristiques des fibres lentes (I) et des fibres rapides (II).

- les isoformes développementales embryonnaire et fœtale, présentes au cours de la vie fœtale

- les isoformes lentes de type I, principalement la MHC I

- les isoformes rapides dont les MHC IIa, IIb et IIx. D'autres formes minoritaires se trouvent dans certains muscles particuliers.

Ces différentes isoformes sont à l'origine de la classification des fibres musculaires en fibres lentes ou rapides (Hughes *et al.*, 1999). Les fibres de type I ou « fibres rouges » car riches en myoglobine sont à contraction lente. Elles n'expriment que des chaînes lourdes de myosine MHC I et ont une faible activité ATPasique (Tableau 4). Elles sont riches en mitochondries et sont donc identifiables en histoenzymologie, par leur richesse en enzymes oxydatives. Les fibres de type II ou « fibres blanches » sont à contraction rapide (Tableau 4). Elles contiennent des chaînes lourdes de myosine MHC II, dont trois types principaux existent : les fibres IIA, les fibres IIB et les fibres IIX, qui expriment respectivement, les MHC IIa, IIb et IIx. Les fibres IIA sont caractérisées par un métabolisme oxydo-glycolytique, les fibres IIB par un métabolisme glycolytique, et les fibres IIX, par un métabolisme oxydo-glycolytique intermédiaire. Elles sont riches en glycogène et fonctionnent principalement par la voie de la glycolyse anaérobie. Elles ont une forte activité ATPasique.

L'acquisition progressive des isoformes adultes de type I et de type II tout au long de la vie fœtale, permettra ainsi d'obtenir à la naissance, des muscles différenciés de type lent, mixte ou rapide, selon les proportions et la qualité des fibres qui les composent.

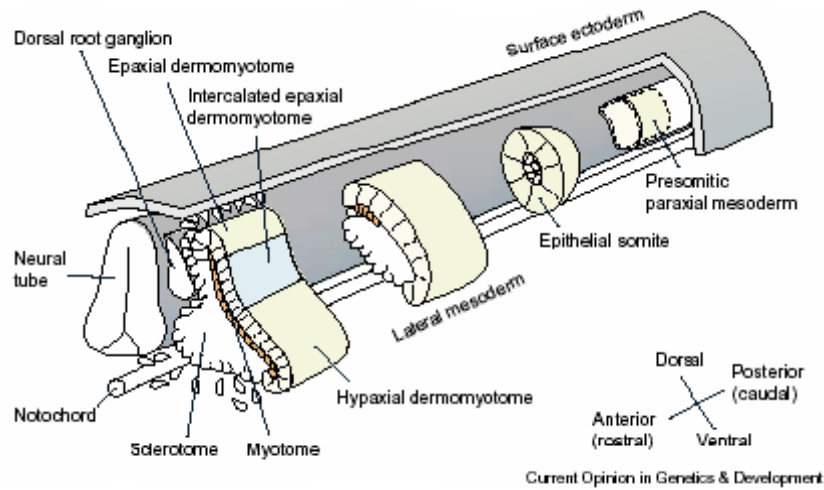


Figure 6 : Représentation schématique de la somitogenèse chez les vertébrés.

Les somites sont formées et évoluent selon un gradient rostro-caudal de part et d'autre de l'axe central, représentés par le tube neural et la notochorde. Les somites vont ensuite se subdiviser en deux compartiments : la partie ventrale, à l'origine du sclérotome, et la partie dorsale, à l'origine du dermomyotome.

(D'après Buckingham, 2003).

Origine embryonnaire et développement du muscle squelettique.

Les renseignements apportés dans ce chapitre, font état des connaissances actuelles sur l'origine embryonnaire de la musculature, qui résultent de nombreux travaux réalisés à partir d'espèces aussi diversifiées que les oiseaux (le poulet et la caille) et les mammifères (la souris).

III.1. Origine embryonnaire du muscle squelettique.

Chez les vertébrés, les cellules précurseurs myogéniques des muscles squelettiques dérivent des cellules somitiques multipotentes (Figure 6) (Eloy-Trinquet and Nicolas, 2002). Les somites sont des structures sphériques issues de la segmentation du mésoderme paraxial suivant un axe antéro-postérieur de part et d'autre du tube neural et de la notochorde. Elles vont se compartimenter en un épithélium dorsal, le dermomyotome, à l'origine du derme et des muscles squelettiques, et en un mésenchyme ventral, le sclérotome, à l'origine des vertèbres, des os, du cartilage et des côtes. La région dorso-médiane du dermomyotome se différencie pour donner la musculature paraxiale à l'origine des muscles intercostaux et paraspinaux associés à la colonne vertébrale. La région ventro-latérale va former la musculature hypaxiale qui va donner les muscles des membres et de la ceinture (Buckingham, 2001; Buckingham *et al.*, 2003). Certaines cellules myogéniques résultant du dermomyotome seront à l'origine de quelques muscles de la tête alors que les autres seront issus des mésodermes paraxial et préchordal.

L'organisation des somites en différents compartiments, est réalisée sous le contrôle du tube neural, de la notochorde et de l'ectoderme (Buckingham, 2001). Ces tissus sécrètent des facteurs capables de stimuler ou d'inhiber la myogenèse au niveau du myotome (Pirskanen *et al.*, 2000). Ainsi, les facteurs Wnts (*Wingless*), produits par la partie dorsale du tube neural et la surface de l'ectoderme, et Shh (*Sonic hedgehog*), sécrété par la notochorde et le plateau du tube neural, ont été identifiés comme des effecteurs positifs de la myogenèse. Inversement, BMP4 (Bone Morphogenic Factor-4), sécrété dans la partie dorsale des somites, et Notch, antagoniste de Wnts, sont des effecteurs négatifs de la somitogenèse (Buckingham, 2001).

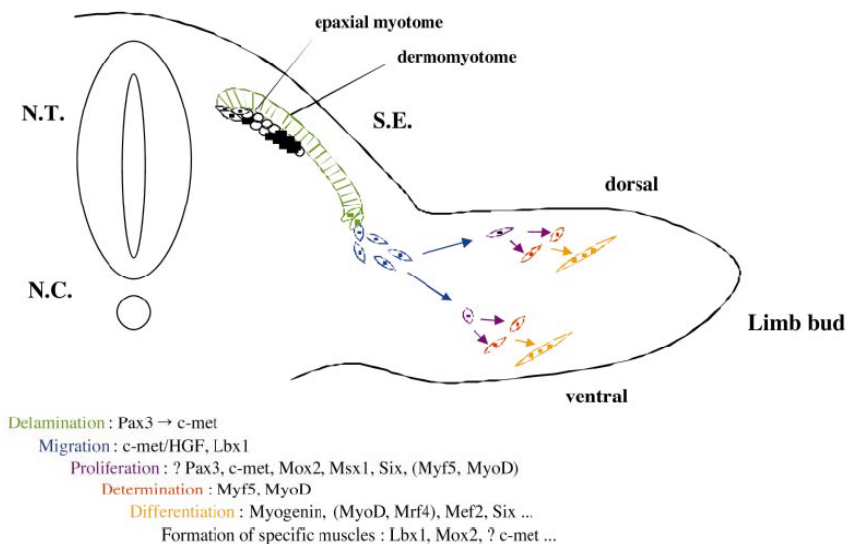


Figure 7 : Représentation schématique de la formation du muscle squelettique au niveau des membres, chez les Vertébrés.

Les cellules précurseurs se détachent de la partie dorsale des somites, le dermomyotome, migrent vers les bourgeons des membres où elles prolifèrent et expriment différents facteurs myogéniques avant de se différencier en muscle squelettique. Chaque étape, et les gènes potentiellement associés, sont représentés par différentes couleurs.

NC: notochorde; NT: tube neural; SE: surface ectodermique. (D'après Buckingham *et al.*, 2003).

Gène	Phénotype mutant/ fonction potentielle
Pax3 ^{-/-}	Il y a désintégration du dermomyotome hypaxial, mais perte des cellules musculaires précurseurs et pas de détermination, pas de migration, pas de muscles des membres.
c-Met ^{-/-} /HGF ^{-/-}	Le dermomyotome hypaxial est intact, mais il n'y a pas de détachement des cellules musculaires précurseurs et pas de muscles des membres.
Gab1 ^{-/-}	Le détachement et la migration des cellules musculaires sont diminués, certains muscles spécifiques sont affectés.
Lbx1 ^{-/-}	Détachement des cellules musculaires précurseurs mais migration incorrecte, certains muscles spécifiques sont affectés.
Mox2 ^{-/-}	La migration semble normale, mais certains muscles spécifiques sont affectés.
Msx1	Il serait impliqué dans la prolifération des cellules musculaires précurseurs des membres avants.
Six1,4(5)	Il est exprimé dans le dermomyotome hypaxial, dans les cellules musculaires précurseurs en migration et dans les muscles des membres. Il serait impliqué dans les processus de spécification et de différenciation terminale des cellules musculaires.

Tableau 5 : Protéines « homeobox » impliquées dans la formation des muscles des membres avant le démarrage de la myogenèse.

Ces gènes sont impliqués dans la survie, le détachement et la migration des cellules progénitrices, à partir du dermomyotome épaxial jusqu'aux sites de formation des muscles du corps et des membres.

(D'après Buckingham, 2001)

Avant de se différencier, les cellules précurseurs sont donc localisées dans le dermomyotome (Venters and Ordahl, 2002; Venters *et al.*, 1999), et reçoivent des signaux dorsaux, inducteurs du programme myogénique avec l'expression des gènes de détermination myogéniques (Figure 7), déjà présents dans le dermomyotome épaxial (et hypaxial) (Tajbakhsh and Buckingham, 2000). L'axe dorso-ventral des somites est déterminé très rapidement après la formation des somites épithéliales, avec l'acquisition du devenir myogénique avant celui du sclérotome, ventralement.

Les muscles de la région des membres sont formés à partir de cellules précurseurs musculaires migratrices (Buckingham *et al.*, 2003). Ces cellules migratrices issues de la partie ventro-latérale du dermomyotome subissent une transformation épithélio-mésenchymateuse et migrent individuellement vers les bourgeons des membres (Figure 7). Arrivés au niveau des membres, ces précurseurs myogéniques vont se multiplier par mitoses pour enfin fusionner et se différencier en différents groupes musculaires. Ces cellules migratrices expriment Pax-3, un membre de la famille des facteurs de transcription « paired-box » ou « homeobox », et le développement des muscles des membres est dépendant de l'expression de ce gène (Buckingham *et al.*, 2003; Venters *et al.*, 2004). Il joue un rôle important dans la mise en place et la survie du dermomyotome hypaxial, ainsi que dans les processus de détachement et de migration des cellules progénitrices.

D'autres facteurs de transcription « homeobox » sont impliqués dans la survie, le détachement et la migration des cellules musculaires précurseurs du dermomyotome hypaxial jusqu'aux sites de formation des muscles du corps et des membres (Figure 7). Des expériences d'inactivation de gènes chez la souris ont permis d'identifier précisément leurs rôles au cours de la somitogenèse (Tableau 5). Ainsi, *Lbx1* est sécrété par les cellules migrantes et dans le myotome hypaxial des somites, qui leur donne naissance. *c-Met* et son ligand *HGF* (scatter factor, *SF*) sont essentiels pour le détachement des cellules du dermomyotome, et leur taux semble important pour l'amorçage du processus de migration de ces cellules. L'absence de *Gab1*, qui est également un ligand de *c-Met*, réduit le détachement des cellules ce qui provoque des défauts de la formation des masses musculaires au niveau des membres et du diaphragme. Les mutants *Mox2*, entraînent aussi des malformations des muscles des membres alors que les cellules migrent normalement. En fait, la délétion sélective de ces gènes, et notamment des gènes *Lbx1*, *Mox2* et *c-Met-Grb2*, provoquent des malformations au niveau de muscles spécifiques et distincts (Buckingham, 2001).

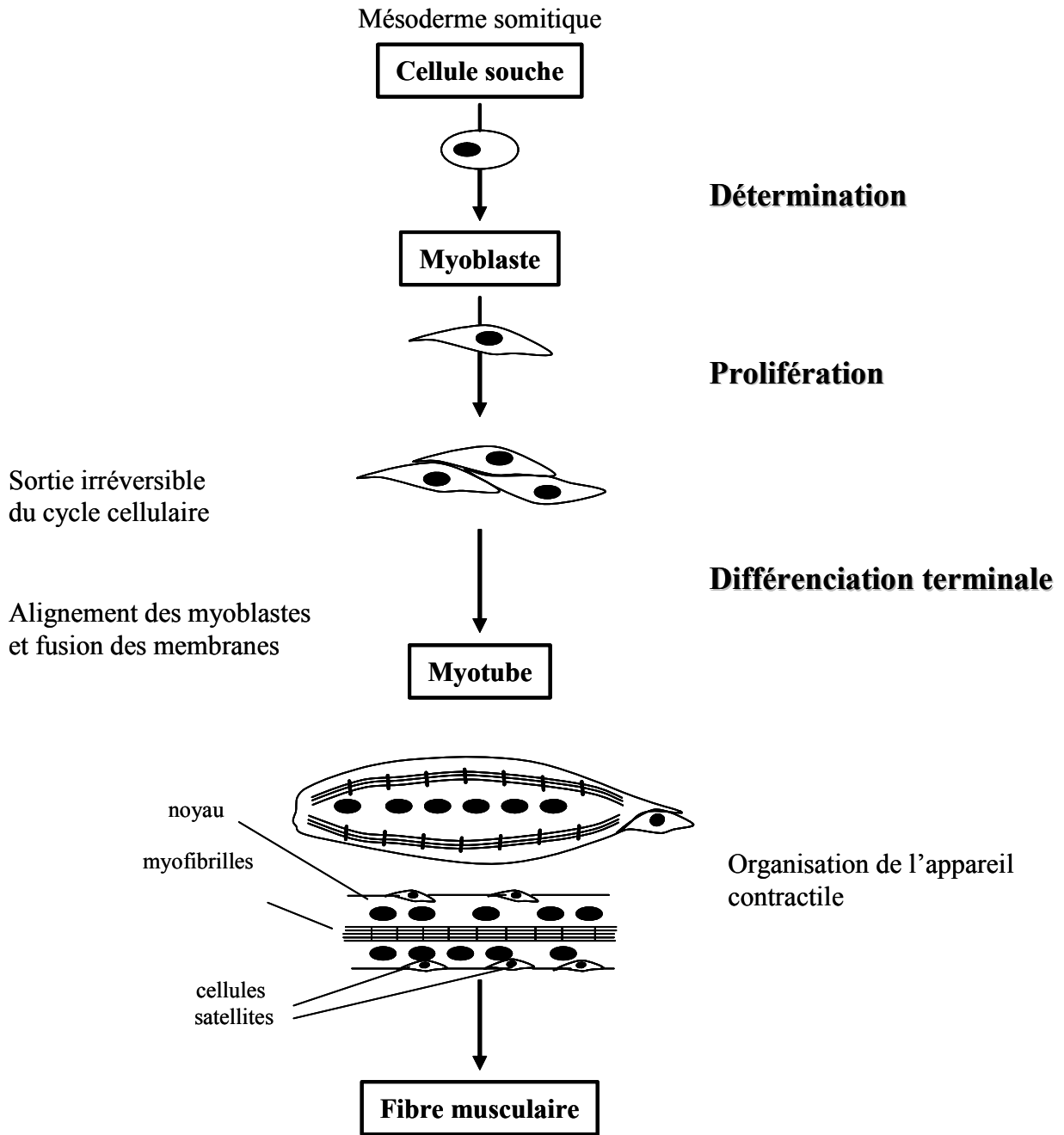


Figure 8 : Schéma illustrant la séquence des évènements qui caractérisent la différenciation et la maturation des cellules musculaires.

III.2. Différenciation des myoblastes en myotubes contractiles.

La différenciation et la maturation des cellules musculaires se fait en trois temps : prolifération, fusion et différenciation. L'agrégation et la fusion des myoblastes pour former des myotubes sont une étape à part entière de la myogenèse (Figure 8).

Chez les vertébrés, au cours de leur migration des somites jusqu'aux sites de formation des muscles, les myoblastes (ou pré-myoblastes) prolifèrent (Kenny-Mobbs and Thorogood, 1987). Arrivés au sein des masses pré musculaires ils vont alors arrêter leur phase mitotique, et quitter le cycle cellulaire de manière irréversible pour fusionner et former des myotubes embryonnaires primaires. Ensuite des myotubes secondaires sont ajoutés parallèlement aux myotubes primaires, et une phase supplémentaire de croissance apparaît avec la fusion de cellules satellites. Plusieurs types de myotubes participent donc à la formation du muscle final et les caractéristiques des fibres musculaires qui le composent sont très influencées par leur innervation (Sacks *et al.*, 2003). Cependant comme les myotubes primaires se forment indépendamment de leur innervation, d'autres facteurs de régulation doivent contrôler la fusion des myoblastes et la diversification des fibres qui apparaissent au cours de la myogenèse primaire (Hughes and Salinas, 1999).

Les myoblastes sont donc des cellules post-mitotiques capables de fusionner et de synthétiser des protéines, dont des protéines de surface et des myosines. Il est intéressant de noter que les pré-myoblastes en réplication expriment déjà un phénotype musculaire spécifique car très tôt l'expression de filaments intermédiaires de desmine est observable. Cette synthèse semble être initiée en phase G₂ du cycle cellulaire des pré-myoblastes en réplication (Buckingham, 2001; Venters *et al.*, 1999).

Ces myoblastes post-mitotiques mononuclées vont fusionner pour former des myotubes multinuclées. Ce mécanisme résulte d'une séquence de plusieurs événements successifs qui comprend l'alignement des myoblastes selon leur axe longitudinal, les étapes de reconnaissance et d'adhésion intercellulaire, et enfin, l'union des bicouches lipidiques des myoblastes adjacents afin d'établir une continuité cytoplasmique entre les cellules (Wakelam, 1985).

Les myotubes se différencient et accumulent les protéines contractiles actine et myosine qui sont arrangées en faisceaux, ce sont les myofibrilles. L'arrangement de ces protéines contractiles en filaments fins d'actine et en filaments épais de myosine, sera à l'origine des unités contractiles répétées visibles le long des myofibrilles, les sarcomères.

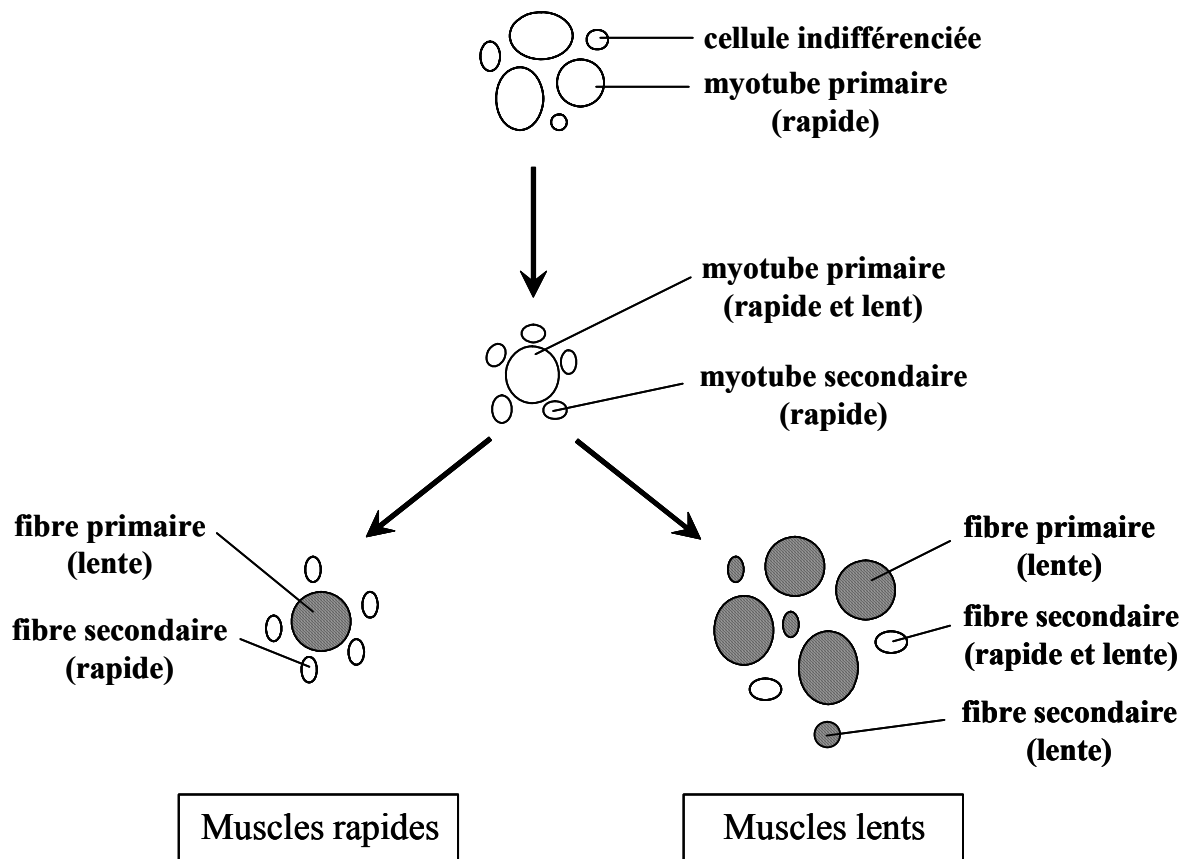


Figure 9 : Mise en place des différents types de fibres musculaires chez le rat.

Lors de la mise en place du tissu musculaire, la deuxième génération de myoblastes évolue en myotubes secondaires qui s'organisent autour des myotubes primaires. Les myotubes primaires seront à l'origine des fibres lentes, alors que les myotubes secondaires, plus petits, donneront des fibres rapides ou lentes suivant le type de muscle (D'après Guernec, 2003).

Initialement, ces myofibrilles sont situées à la périphérie des myotubes nouvellement formés au centre desquels se concentrent les différents noyaux. Ces derniers sont par la suite repoussés vers la périphérie du myotube par les myofilaments qui s'organisent au centre selon l'axe longitudinal de la cellule. Les myotubes accumulent également des protéines régulatrices des protéines contractiles comme la tropomyosine et la troponine et des enzymes cytoplasmiques nécessaires à l'énergétique de la cellule comme la myokinase et la phosphocréatine kinase.

Certaines cellules restent à l'état mononuclée entre la membrane basale et la membrane plasmique des fibres musculaires squelettiques et représentent un réservoir de cellules précurseurs myogéniques indifférenciées : les cellules satellites.

III.3. Diversité des fibres musculaires.

Comme cela a été évoqué précédemment, plusieurs lignées myoblastiques interviennent à différentes périodes du développement, pour former des myotubes primaires et secondaires, en deux vagues successives (Ruiz-Gomez *et al.*, 2000) (Figure 9).

Les myoblastes de première génération ou myoblastes embryonnaires, apparaissent au stade embryonnaire. Ils fusionnent pour former les myotubes de première génération ou myotubes primaires, à l'origine principalement, des fibres lentes, mais aussi de fibres rapides dans les muscles entièrement rapides (Stockdale and Miller, 1987).

Les myoblastes de seconde génération ou myoblastes fœtaux apparaissent au cours de la vie fœtale. Ils vont former les myotubes de seconde génération ou myotubes secondaires, à l'origine des fibres rapides en majorité, mais également des fibres lentes dans les muscles entièrement lents ou mixtes (Stockdale and Miller, 1987). Ces myotubes secondaires se développent autour des myotubes primaires, moins nombreux et plus gros et qui leur servent de support.

Une troisième génération de myoblastes a été mise en évidence dans différentes espèces. En effet après les deux vagues précédentes, des cellules de petite taille sont observées chez le porc (Lefaucheur *et al.*, 1995), le mouton (Wilson *et al.*, 1992), l'homme (Draeger *et al.*, 1987) et le bovin (Duris *et al.*, 1999). Cette génération n'étant observée que chez des mammifères de grande taille, Lefaucheur *et al.* (1995) suggèrent un rôle de ces myoblastes dans l'origine des masses musculaires plus importantes de ces animaux. Chez le bovin comme chez l'homme, ils semblent être à l'origine des fibres IIA. Ces cellules de petite taille expriment généralement des formes développementales de myosine et se positionnent

autour des myotubes primaires, au voisinage des myotubes secondaires. Chez le bovin, comme chez le mouton et l'homme, les myoblastes de troisième génération sont détectés à la fin des deux premiers tiers de la vie foetale.

Enfin, il existe une autre lignée myogénique dite adulte: les cellules satellites. Elles sont considérées comme les précurseurs quiescents présents pendant les périodes postnatale et adulte (Buckingham *et al.*, 2003; Campion, 1984). Lors de la croissance postnatale et de la régénération des fibres adultes endommagées, les cellules quiescentes reproduisent un programme myogénique séquentiel, similaire à celui observé lors du développement. Elles vont se diviser et se différencier, avant de fusionner avec les fibres existantes ou former de nouvelles fibres. La deuxième cellule issue de la division reste à l'état quiescent.

III.4. Variabilité génétique des fibres musculaires.

La transformation des fibres musculaires est très bien documentée dans certaines espèces comme le porc ou le mouton, mais chez le bovin, les résultats, souvent contradictoires sont peu publiés, notamment les informations sur l'existence d'une variabilité génétique chez les animaux « hypermusclés » qui pourrait être à l'origine de l'hypertrophie musculaire. La détermination du début d'induction des phases de prolifération et de différenciation, ainsi que leur durée, sont à l'origine de la quantité et du type de fibres qui composent chaque muscle. Elles sont, par conséquent, à l'origine, en partie, du métabolisme énergétique de chaque muscle.

Parmi les données publiées, il a été montré à partir de coupes histologiques de muscle *Semi tendinosus* foetal, marquées par des anticorps spécifiques des différentes isoformes de MHC, que la différenciation des fibres musculaires de fœtus bovin « hypermusclé » était retardée pendant les deux premiers tiers de la vie foetale, à cause d'une phase de prolifération intense et d'une phase de fusion ralentie (Picard *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 1995b). Cette diminution du taux de fusion est en fait observable pendant la première et la seconde génération de myoblastes, ce retard étant rattrapé en fin de gestation. L'augmentation de masse musculaire de ces animaux pourrait être due à une augmentation du nombre de fibres secondaires car il semble que ce sont les myoblastes de seconde génération qui sont en nombre plus important dans les fœtus bovins « hypermusclés » de 110 j (Duris *et al.*, 1999). Les observations sur la diminution de l'index de fusion et le retard de différenciation, sont également appuyées par les résultats montrant une accumulation plus lente des MHC IIA et IIB, marqueurs tardifs de la différenciation, alors que les MHC foetales et de type I

apparaissent prématurément. Wegner et al., (2000), ont quant à eux publié des données montrant une évolution similaire de la transformation des fibres de type IIA en type IIB après la naissance, en fonction de l'âge, chez des bovins « normaux » et « hypermusclés ». En effet, les fibres rapides de type IIA se transforment en fibres de type IIB, alors que la quantité de fibres lentes de type I reste constante, à l'exception près, que la quantité de fibres de type IIB chez les animaux « hypermusclés » est déjà supérieure à la naissance. Cette plus grande proportion de fibres IIB est présente dès le dernier tiers de la vie fœtale (Gagnière *et al.*, 1999a). Ces animaux possèdent donc des muscles contenant plus de fibres rapides et moins de fibres lentes et intermédiaires que les animaux à croissance musculaire normale.

III.5. Différenciation métabolique des fibres musculaires.

La différenciation métabolique des muscles bovins est précoce et a lieu au cours de la vie fœtale, contrairement à d'autres espèces comme le porc (Ashmore *et al.*, 1973) ou le poulet (Bacou and Vigneron, 1976) où elle n'a lieu qu'à la naissance. Ainsi, les muscles peuvent être classés très tôt en fonction de leur type métabolique, le métabolisme oxydatif étant prédominant à cette période comme dans les autres espèces. Cette tendance s'inverse ensuite au cours de la période néonatale.

Chez les animaux hypermusclés, la mise en place du métabolisme oxydatif est retardée (Gagnière *et al.*, 1997), et le métabolisme énergétique prédominant chez ces animaux est un métabolisme de type glycolytique, lié à une proportion plus importante de fibres IIB.

La composition en fibres et l'acquisition du métabolisme énergétique est cependant variable d'un muscle à l'autre. Ainsi, le muscle *Diaphragma*, se différencie très tôt et acquiert rapidement ses formes adultes de MHC de type I (Gagnière *et al.*, 1999b). Cette précocité peut s'expliquer par le fait que ce muscle doit être fonctionnel dès la naissance. Quant au muscle *Masseter* (muscle lent chez l'adulte), sa différenciation est en retard tout au long de la vie fœtale et elle se poursuit longtemps après la naissance. A ce stade il contient encore 20% de MHC rapides. C'est au moment du sevrage, lorsque l'animal passe d'une alimentation lactée à une alimentation solide et commence à ruminer, que le muscle devient totalement lent (Picard *et al.*, 1995a). Le type de fibres musculaire composant chaque muscle est donc liée à son activité motrice. Chez les animaux « hypermusclés », le retard de différenciation des fibres musculaires est plus ou moins marqué. Ce retard est plus important dans les muscles présentant une forte hypertrophie.

Le typage des fibres musculaires entre des bovins « normaux et des bovins « hypermusclés », a donc permis de mettre en évidence une augmentation du nombre total des fibres chez ces derniers, associée à une augmentation des fibres de type IIB, rapides glycolytiques, et à une diminution des fibres de type IIA, lentes rapides oxydo-glycolytiques (Wegner *et al.*, 2000). Le métabolisme énergétique résultant, majoritairement glycolytique, tend vers une accélération de la vitesse de maturation de la viande, et vers l'obtention d'une viande plus tendre, dont la teneur en gras intramusculaire est plus faible. Même si l'appréciation de ces caractéristiques diverge entre les consommateurs, ces observations permettent d'établir que la quantité de fibres et le métabolisme énergétique de chaque muscle sont deux composantes majeures de la qualité finale de la viande. C'est pourquoi, nous détaillerons dans le chapitre suivant, les différents facteurs myogéniques et facteurs de croissance, qui régulent les différents stades de la différenciation des cellules musculaires, et à plus long terme, la mise en place du tissu musculaire squelettique.

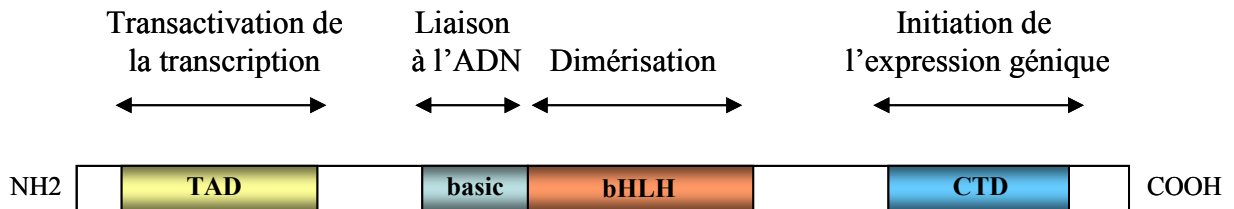


Figure 10 : Structure schématique du facteur de transcription MyoD.

Un domaine de transactivation est présent dans la partie N-terminale de la protéine (TAD: *Transactivation Amino-terminal Domain*). Le domaine bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), constitué de deux α -hélices, permet la dimérisation avec les protéines E. Sa partie basique, en position N-Terminale, permet la fixation de la protéine au niveau des boîtes E (E-box), présentes dans les séquences promotrices de nombreux gènes. Dans cette partie, ont également été identifiés des résidus Histidine et Cystéine, nécessaires au remodelage de la chromatine pour l'activation de la transcription. Le domaine C-terminal (CTD: *C-terminal Domain*), également en α -hélice, confère l'activité spécifique pour initier l'expression des gènes musculaires endogènes.

(D'après Bergstrom *et al.*, 2001).

Régulation de la myogenèse.

IV.1. Les facteurs myogéniques et leurs protéines d'interaction.

Les facteurs myogéniques interviennent dans la régulation de la myogenèse, de la prolifération des myoblastes jusqu'à leur différenciation en myotubes, participant ainsi au contrôle du développement et de la mise en place du tissu musculaire squelettique. Les protéines de la famille MyoD ont été décrites comme des facteurs de détermination myogénique, à cause de leur capacité à induire un devenir myogénique à des cellules non musculaires (Buckingham, 1992). Leur expression est restreinte au muscle squelettique. Durant toute la myogenèse, de nombreux signaux externes, positifs ou négatifs, vont influencer l'activation spatio-temporelle de ces facteurs myogéniques, qui sera déterminante pour l'induction de la différenciation des cellules musculaires (Puri and Sartorelli, 2000).

Les facteurs myogéniques appartiennent à la famille des facteurs de transcription à motif bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) et vont activer la transcription de gènes cibles en se liant directement sur une séquence consensus « CANNTG » de l'ADN, appelée boîte E (Puri and Sartorelli, 2000). Cette séquence est retrouvée dans les promoteurs de nombreux gènes muscles-spécifiques, mais pas dans tous, ce qui suggère une activation directe et indirecte de la transcription par les facteurs myogéniques. Ils sont quatre: MyoD (Myoblast Determination gene), Myf5 (Myogenic factor 5), Myogénine et MRF4 (Muscle Regulatory Factor 4). Leurs domaines bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) (Figure 10) vont se complexer en homodimères, mais aussi en hétérodimères, avec des co-facteurs ubiquitaires codés par le gène *E2A*, les protéines E12 et E47 majoritairement, dont la partie basique se lie aussi au motif muscle-spécifique. Durant toute la myogenèse ils agiront de concert avec ces protéines et les membre de la famille MEF2 (*Muscle Enhancer Factor 2*) pour activer le programme de différenciation et induire la transcription des gènes de régulation et des gènes structuraux muscles-spécifiques.

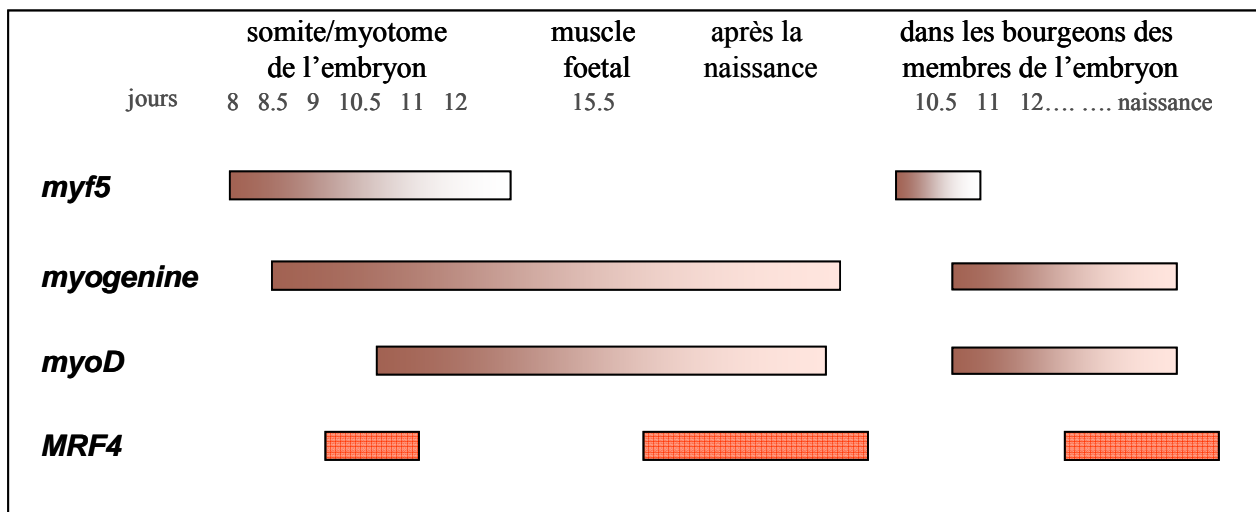


Figure 11 : Représentation schématique de l'expression des gènes myogéniques de la famille MyoD, au cours du développement musculaire de la souris.

Ces résultats sont obtenus à partir d'hybridations *in situ* réalisées dans l'embryon de souris, et montrent l'expression temporelle des transcrits, lorsqu'ils commencent à s'accumuler dans les somites et les bourgeons des membres.

(D'après Buckingham, 1992).

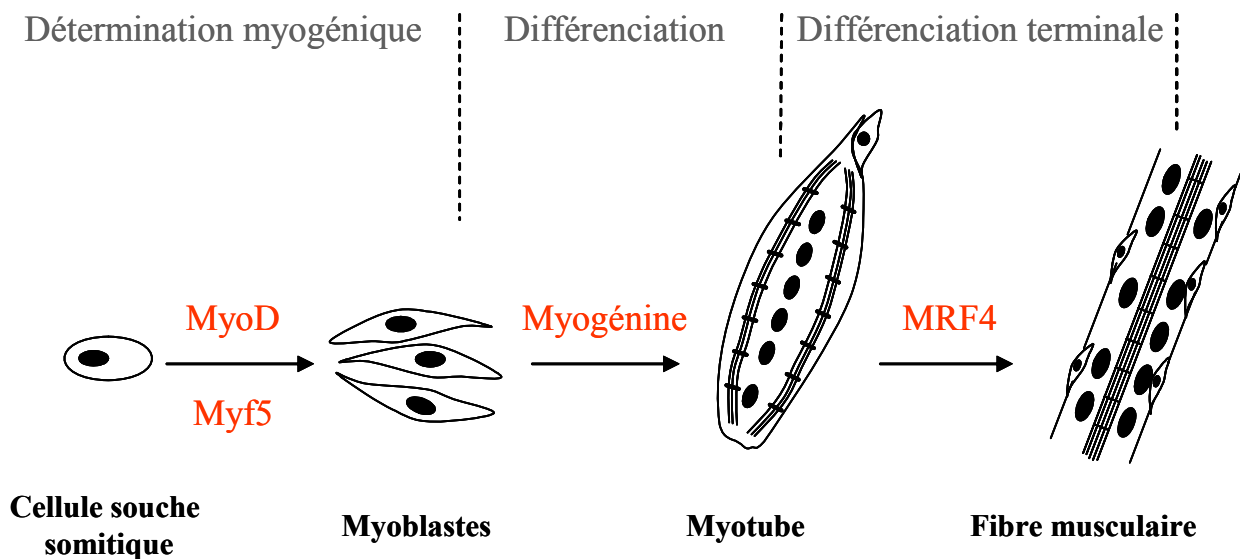


Figure 12 : Expression des facteurs myogéniques de la famille MyoD au cours de la myogenèse.

MyoD et Myf5 induisent la spécification des myoblastes alors que la Myogénine et MRF4 sont importants pour la différenciation terminale.

IV.1.1. Cinétique d'expression.

Chaque facteur myogénique a un profil d'expression différent des autres au cours de la myogenèse, qui diffère également entre les somites et les masses pré-musculaires des membres. En culture, ce profil varie aussi selon la lignée musculaire (Buckingham, 1992).

In vivo, chez la souris, *myf5* s'exprime très tôt dans le somite, dès 8 jours de gestation (Figure 11). Puis son expression se localise dans le myotome lorsque le somite s'est différencié, et diminue progressivement pendant la myogenèse. Dans les muscles des membres, c'est également le premier facteur à s'exprimer. Les transcrits *myogénine* sont détectés peu de temps après dans les somites, mais les protéines ne sont exprimées que vers 10.5 jours de gestation, en même temps que MyoD. Dans les muscles des membres, les transcrits et les protéines Myogénine et MyoD s'accumulent en même temps. L'expression de MRF4 est biphasique : un premier pic d'une durée de 48 heures est détectable à partir de 9.5 jours de vie embryonnaire et un second pic pendant la période de vie fœtale, jusqu'à la naissance. C'est le seul facteur myogénique à être exprimé dans les muscles adultes. Cette accumulation transitoire des transcrits de MRF4 dans le myotome, peut être reliée à l'absence initiale de la protéine Myogénine, car les facteurs myogéniques sont toujours présents par paire dans les cellules musculaires en différenciation.

In vitro, des taux élevés de transcrits *myoD* peuvent être détectés dans les myoblastes de certaines lignées cellulaires murines, contrairement à d'autres, qui contiennent davantage de transcrits *myf5* (Figure 12). La Myogénine est toujours exprimée dans les cellules qui se différencient, et les transcrits *MRF4* s'accumulent uniquement dans les cultures en fin de différenciation, quand les gènes de structure caractéristiques des fibres matures sont activés.

IV.1.2. Redondance de leurs activités myogéniques.

Des expériences sur des souris transgéniques délétées d'un ou plusieurs gènes codant ces facteurs myogéniques ont permis de mieux comprendre leur rôle respectif et l'importance de leur expression spatio-temporelle sur la formation des muscles, et à posteriori sur la viabilité des souris.

Des souris dont le gène *myf5* ou *myoD* a été invalidé, présentent un développement normal du tissu musculaire squelettique, alors que des souris doubles mutantes *myf5*^{-/-} et *myoD*^{-/-}, ne possèdent plus de myoblastes et de muscle squelettique différencié au niveau de la tête, du tronc et des membres (Kablar *et al.*, 2003) (Figure 13). Elles meurent aussitôt après

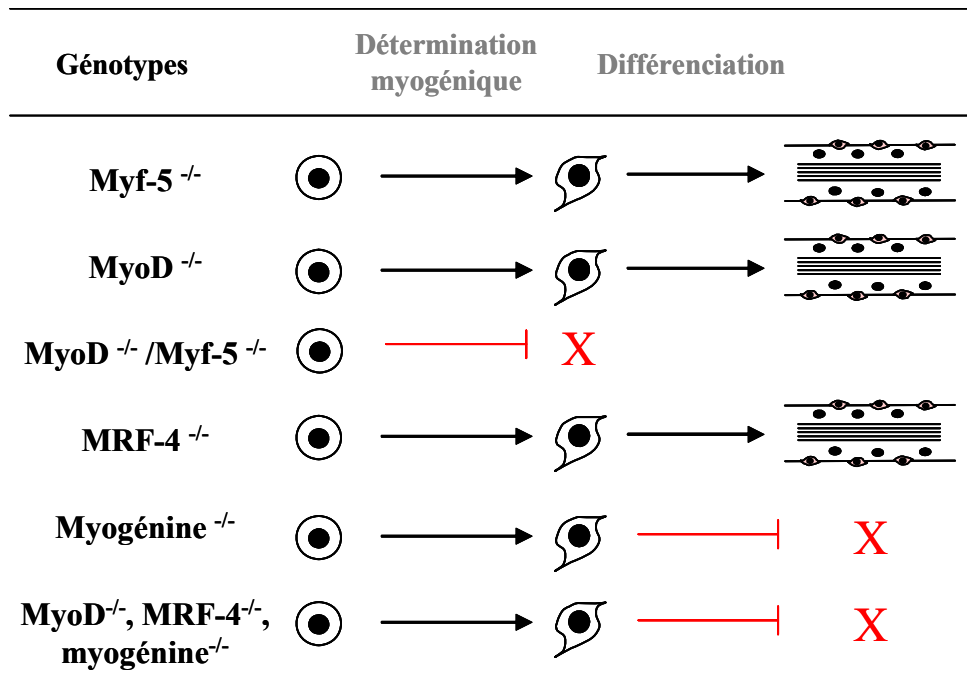


Figure 13 : Invalidation des facteurs myogéniques chez la souris.

Ce tableau récapitule les résultats obtenus lors de l'invalidation des facteurs myogéniques chez la souris. Une croix (X) indique un arrêt dans le processus de myogenèse du fait de la mutation.

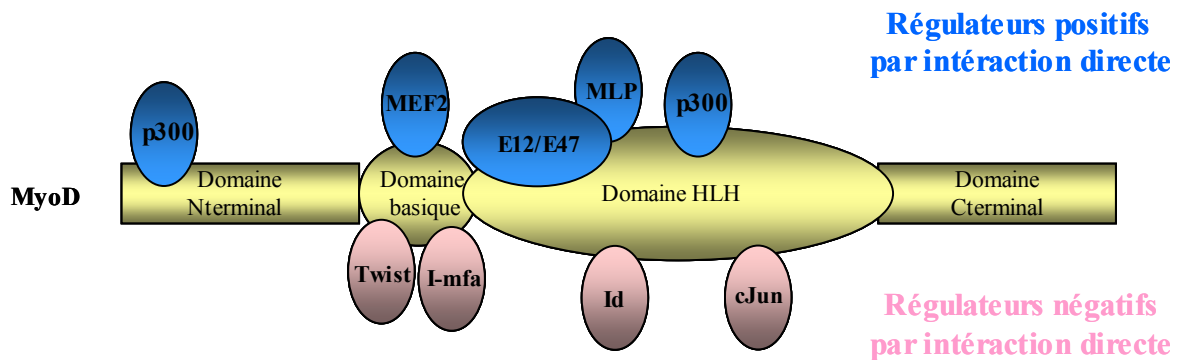
(D'après Guernec, 2003)

la naissance. L'expression de ces deux facteurs peut donc se compenser. Cependant, on ne peut pas dire que leur activité est redondante car ils déterminent chacun la spécification précoce de cellules musculaires distinctes. Myf5 dirige la formation des muscles à partir des cellules issues du dermomyotome épithélial (muscles du dos et intercostaux), et MyoD, permet le développement des muscles à partir des cellules migrantes (muscles des membres, du diaphragme, de la langue et des arcs branchiaux) (Kablar *et al.*, 2003). De plus, l'expression et la localisation de Pax3 dans les embryons de souris *myf5*^{-/-} et *myoD*^{-/-} ne sont pas perturbées. La migration des cellules précurseurs multipotentes dans les membres n'est donc pas affectée par l'absence d'expression de ces deux facteurs. (Kablar *et al.*, 2003). Cependant, elles ne pourront pas acquérir un devenir myogénique. MyoD et Myf5 sont donc les facteurs de détermination des myoblastes squelettiques.

Les souris dont le gène *myogénine* a été invalidé naissent avec de sévères malformations musculaires et meurent après la naissance. Toutes les régions sont constituées de larges cellules mononuclées et d'un nombre réduit de fibres musculaires différenciées (Venuti *et al.*, 1995) (Figure 13). Son expression ne semble pas requise pour l'expression de *myoD*, car celui-ci est normalement exprimé chez les souris mutantes *myogénine*^{-/-}. Chez ces souris, les masses musculaires se développent de manière identique à celles des embryons sauvages, cependant, les cellules n'expriment pas les marqueurs spécifiques en même temps et en même quantité. L'organisation tissulaire est différente et les myocytes différenciés sont très peu nombreux. Les différences sont encore plus importantes au moment de la formation des fibres musculaires secondaires. L'absence de myogénine a des effets plus sévères sur la myogenèse secondaire (Venuti *et al.*, 1995). Par conséquent, la Myogénine est indispensable à l'induction de la différenciation terminale des cellules musculaires, en aval de Myf5 et MyoD.

Enfin, les souris dont le gène *Mrf4* a été invalidé présentent quelques altérations de l'expression des gènes musculaires, associées à une augmentation de l'expression de *myogénine*, mais avec un développement musculaire quasi normal (Figure 13). Par contre, les doubles mutants *Mrf4*^{-/-} et *myoD*^{-/-}, présentent de sévères déficiences musculaires, malgré l'expression normale de la Myogénine. MyoD et MRF4 sont donc nécessaires à l'action de la myogénine sur la différenciation des cellules musculaires. Cette absence est compensée par une forte expression de myogénine. L'expression des facteurs MRF4 et Myogénine peut se compenser, mais l'expression de MRF4 reste indispensable à l'induction de la différenciation terminale des cellules musculaires (Valdez *et al.*, 2000).

A



B

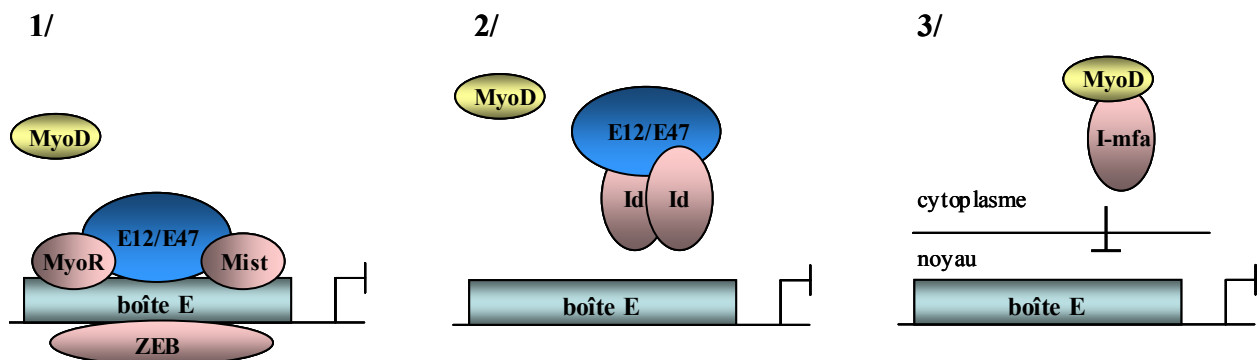


Figure 14 : Représentation schématique de quelques régulateurs positifs et négatifs de MyoD, par des mécanismes d'interaction directe ou indirecte.

A: Régions distinctes de MyoD qui ont été décrites comme s'associant avec des protéines activatrices, représentées en bleu, ou avec des protéines inhibitrices, représentées en rose. MyoD peut être considéré comme représentatif des autres facteurs myogéniques, même si quelques unes de ces interactions n'ont pas été décrite pour la Myogenine, Myf5 et MRF4.

B: Mode d'action de certains répresseurs par des mécanismes indirects. 1/ fixation sur la boîte E; 2/ interaction avec les partenaires positifs; 3/ séquestration dans le cytoplasme.

(D'après Puri & Sartorelli, 2000)

Ces facteurs myogéniques ont donc des activités spécifiques, complémentaires et partiellement redondantes. Cependant le contrôle de leur expression spatio-temporelle est indispensable.

IV.1.3. Les protéines d'interaction agonistes et antagonistes.

Les facteurs myogéniques bHLH interagissent avec de nombreuses protéines, qui vont réguler, positivement ou négativement, la transcription des gènes muscles-spécifiques, et par conséquent l'activation ou non de la différenciation des cellules musculaires (Figure 14).

IV.1.3.1. Les protéines activatrices.

Les protéines non myogéniques E12 et E47 s'associent en hétérodimères avec les facteurs myogéniques, renforcent leur liaison à l'ADN sur la boîte E, et ainsi activent la transcription de gènes muscles-spécifiques. D'autres co-régulateurs muscles-spécifiques vont activer la transcription. Les membres de la famille MEF2, qui sont codés par quatre gènes chez les vertébrés: *mef2a* (*muscle enhancer factor 2a*), *mef2b*, *mef2c* et *mef2d*, sont tous caractérisés par un motif MADS (*MCMI*, *Agamous*, *Serum Response Factor*) et un domaine MEF2 amino-terminal. Différents types d'association entre ces protéines et les facteurs myogéniques induisent l'expression des gènes muscles-spécifiques, en se fixant sur les boîtes E présentes dans les promoteurs. Ces protéines semblent être importantes pour la formation et la stabilisation de ce complexe transcriptionnel actif (Johanson *et al.*, 1999). Néanmoins, dans certains cas, la présence d'une boîte MEF2 à proximité d'une boîte E dans le promoteur, est nécessaire à l'activation des gènes muscles-spécifiques. Le domaine MEF2 reconnaît alors une séquence consensus riche en A/T, la boîte MEF2 (Wang, D. Z. *et al.*, 2001), souvent située à proximité des boîtes E dans les régions activatrices des gènes. La transcription des gènes muscles-spécifiques nécessiterait l'activation simultanée de ces deux boîtes. Cependant, Dodou *et al* (2003) viennent de montrer que l'expression de *mef2c*, le premier à être exprimé dans le muscle squelettique, est directement activée par les facteurs bHLH qui se fixent sur les boîtes E de sa région promotrice, et que le site A/T présent, ne lie aucun membres de la famille MEF2 pour autoréguler son expression.

Les protéines MEF2 sont impliquées dans le contrôle des étapes tardives de la différenciation terminale des cellules musculaires, puisque d'une part, elles ne peuvent l'induire seule (Molkentin *et al.*, 1995), et d'autre part, parce que leur expression est induite par les facteurs myogéniques (Dodou *et al.*, 2003; Wang, D. Z. *et al.*, 2001).

D'autres protéines interagissent avec les facteurs myogéniques. Par exemple, la protéine MLP (*Muscle LIM Protein*), qui n'a pas d'activité transcriptionnelle mais qui favorise la fixation des hétérodimères MyoD/E47 à l'ADN (Duan *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 1997), ou encore le co-activateur p300/CBP qui augmente l'activité transcriptionnelle de MyoD et MEF2C. (Figure 14).

IV.1.3.2. Les protéines antagonistes.

Ces inhibiteurs vont exercer leur activité en se complexant directement avec les facteurs myogéniques ou les co-activateurs, et empêcher leur liaison à l'ADN (Puri and Sartorelli, 2000) (Figure 14). Ainsi, la protéine Id (*Inhibitor of DNA-Binding*), contenant le motif de dimérisation bHLH, forme des hétérodimères avec les facteurs myogéniques et avec les protéines E12 et E47 qui ne pourront ainsi se fixer à l'ADN. La protéine Twist agit également en séquestrant les produits du gène *E2A* grâce à son motif bHLH, ou par interaction directe avec MEF2 ou MyoD. Enfin, la protéine I-mfa (*Inhibitor of MyoD family*) retient les facteurs myogéniques dans le cytoplasme en masquant leur site de localisation nucléaire.

D'autres inhibiteurs vont se fixer sur la boîte E et empêcher l'activation de la transcription (Figure 14). MyoR (*Myogenic Repressor*), une protéine à motif bHLH, se lie à E12 et E47 et forment ainsi des hétérodimères qui se fixent à l'ADN mais n'induisent pas la transcription. Une autre protéine à motif bHLH, Mist 1, va former des homodimères qui se fixent sur les boîtes E bloquant ainsi l'accès aux activateurs de la transcription. En fait son domaine amino-terminal activateur de la transcription est remplacé par un domaine répressif. Mist 1 peut aussi former des hétérodimères inactifs avec MyoD. ZEB (*Zinc Finger/Homeodomain protein*) réprime aussi la transcription en se fixant sur les boîtes E mais également en inhibant l'activité de MEF2C. Enfin, les membres de la famille Jun, dont v-Jun, c-Jun et JunB, deviennent inhibiteurs de la myogenèse quand ils sont surexprimés dans les cellules musculaires. Certains auteurs pensent que c-Jun interagit directement avec MyoD pour former un hétérodimère inactif et d'autres pensent qu'il inhibe indirectement l'action de MyoD en séquestrant le facteur co-activateur p300 pendant les stades de prolifération des myoblastes. Daury *et al.*, 2001 ont montré que les fonctions de c-Jun diffèrent en fonction de la nature des protéines avec lesquelles il coopère et qu'il peut ainsi être impliqué dans la stimulation ou la répression de la différenciation.

IV.1.4. Cycle cellulaire et facteurs myogéniques.

De nombreux travaux ont mis en évidence le lien étroit existant entre le cycle cellulaire et le programme de différenciation des myoblastes. Ce programme est marqué par la sortie irréversible des myoblastes en phase G₁ du cycle de réplication pour entrer en phase G₀, état quiescent de la cellule.

Les différents états transitoires du cycle cellulaire sont contrôlés par les complexes cyclines/Cdks (Cyclin-dépendant kinases), par l'état de phosphorylation de la protéine Rb, codée par le gène de susceptibilité au rétinoblastôme, et par l'état d'activation des facteurs de transcription de la famille E2F. Ainsi, en phase G₁ le facteur E2F est maintenu à l'état inactif par la forme hypo-phosphorylée de Rb, et le passage en phase S est lié à sa phosphorylation par les cyclines D/Cdks4, 6 et les cyclines E/Cdk2 qui libère E2F et l'active. L'arrêt de la prolifération est induit par des inhibiteurs des cyclines, les CKIs (Cyclin-dépendant protein Kinase Inhibitors) des familles p16 et p21.

Dans les cellules myogéniques, les facteurs myogéniques et les protéines du cycle cellulaire contrôlent mutuellement leur expression et leur activité. Ainsi, les CKIs agissent parallèlement à la myogénine pour contrôler la différenciation des myoblastes (Guo *et al.*, 2003) et MyoD induit l'expression de p21. Novitch *et al.*, 1999, ont quant à eux montré l'implication de Rb dans la différenciation des myoblastes en réponse à son activation par MyoD.

Facteurs	Effets biologiques sur la formation des myofibrilles
Shh	Stimulation de l'expression de Myf-5
Wnt	Stimulation de l'expression de Myf-5 et de MyoD
BMP	Stimulation de la prolifération et inhibition de la différenciation
TGF- β	Inhibition de la prolifération et de la différenciation
Noggin/Chordin/Follistatine	Inhibition des facteurs de la famille des TGF- β s
GDF-8	Inhibition de la prolifération et de la différenciation
IGF	Stimulation de la prolifération et de la différenciation
FGF	Stimulation de la prolifération et inhibition de la différenciation

Tableau 6 : Facteurs de régulation de la formation des myofibrilles au cours du développement embryonnaire. (D'après Zorzano *et al.*, 2003).

IV.2. Les facteurs de croissance.

Une variété de facteurs extracellulaires va aussi réguler la transcription des facteurs myogéniques et ainsi moduler les différents stades du développement du muscle squelettique, de la détermination des précurseurs myogéniques jusqu'à leur différenciation et la formation des fibres musculaires. Ces facteurs, exprimés dans les régions axiale et latérale de l'embryon en développement, sont importants pour la formation des somites et la détermination des différentes lignées de cellules musculaires, à savoir, les lignées myogéniques épaxiale et hypaxiale. Les facteurs ainsi sécrétés, sont, entre autres, Shh, Wnts les IGFs (Insulin-like Growth Factors), les FGFs (Fibroblast Growth Factors) et les molécules TGF- β s-like (Transforming Growth Factors- β), tels que les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins). Tous ces facteurs régulent la détermination et la différenciation myogénique. Ici nous ne détaillerons que trois grandes familles de facteurs de croissance, qui jouent un rôle crucial dans la promotion de la myogenèse: l'Insuline et les IGFs, les FGFs et la famille des TGF- β s (Tableau 6).

IV.2.1. Famille des Insuline et Insulin-like Growth Factors (IGFs).

L'insuline, IGF-I et IGF-II sont des régulateurs importants du programme de différenciation myogénique, dont l'expression, et celle de leurs récepteurs, est détectée très tôt dans l'embryogenèse, au niveau du tube neural et du mésoderme paraxial. Ces facteurs stimulent à la fois la prolifération et la différenciation des myoblastes en culture (Kocamis *et al.*, 2002). Ils induisent l'augmentation de l'expression des marqueurs du cycle cellulaire et stimulent la prolifération, puis activent les facteurs myogéniques de transcription, l'expression des gènes structuraux du muscle squelettique et induisent la formation des myotubes (Zorzano *et al.*, 2003). Ainsi, IGF-I, dans un premier temps, stimule la prolifération des myoblastes et inhibe la différenciation terminale (Weyman and Wolfman, 1998). Dans un deuxième temps, il induit la différenciation terminale, ainsi que IGF-II et l'insuline (Florini *et al.*, 1996). Pirskanen *et al.* (2000) ont démontré que ces trois facteurs sont également capables d'induire la myogenèse dans les somites *in vitro*, en synergie avec d'autres facteurs tels que bFGF plus TGF- β 1 et Shh.

Les effets distincts d'IGF-I sur la prolifération et la différenciation des myoblastes passent par deux cascades de signalisation intracellulaire : la voie des MAP-kinases (*mitogen-activated protein*) et la voie PI3-kinase (*phosphatidyl-inositol 3*), respectivement (Semsarian

et al., 1999). L'action stimulante d'IGF-I sur la prolifération des myoblastes, est associée à une inhibition de l'expression de *myogénine*. Par conséquent, l'induction de la différenciation, débutera par la levée de cette inhibition, mais aussi par une diminution de l'expression de *myf5* (Mangiacapra *et al.*, 1992).

Ces facteurs peuvent également induire une hypertrophie des myotubes lors du développement du muscle squelettique (Zorzano *et al.*, 2003). *In vitro*, l'ajout d'IGF-I sur des myoblastes en culture, provoque une augmentation de leur activité mitotique, suivie de l'induction de leur programme de différenciation (Semsarian *et al.*, 1999). Cet effet passe par une altération des niveaux d'expression des transcrits *myogénine*, *MRF4*, *myf5*, *p21* et de certaines cyclines. Les souris transgéniques surexprimant IGF-I présentent aussi une hypertrophie musculaire (Musaro *et al.*, 1999), alors que la délétion des gènes codant IGF-I, IGF-II et les récepteurs IGF, conduit à une diminution de la masse musculaire associée à des troubles du développement (Kocamis *et al.*, 2002). Ces trois facteurs jouent donc un rôle fondamental dans la maturation musculaire et dans le développement de la masse musculaire. Récemment, le gène codant IGF-II a été identifié comme responsable d'une hypertrophie musculaire chez le porc (Van Laere *et al.*, 2003). Des manipulations réalisées *in vitro* ont montré qu'une mutation ponctuelle dans l'intron 3 altère la régulation du gène IGF-II.

IV.2.2. Famille des Fibroblast Growth Factors (FGFs).

Les FGFs sont des facteurs solubles séquestrés dans la matrice extracellulaire, liés à des protéoglycannes héparane-sulfate, jusqu'à leur utilisation locale. Le traitement des myoblastes en culture avec ces facteurs, stimule la prolifération et inhibe leur différenciation terminale. *In vivo*, ces molécules contribuent à la formation et à la différenciation terminale du myotome dorsal, en stimulant la prolifération et la survie des cellules (Zorzano *et al.*, 2003). Ces facteurs, exprimés très tôt dans la partie dorsale du tube neural, au moment où les cellules somitiques acquièrent leur caractère myogénique (Stern *et al.*, 1997), sont donc indispensables à l'activation de la myogenèse dans le mésoderme paraxial. Ces facteurs ont aussi été impliqués dans la myogenèse des membres, et il a été supposé que la signalisation par les récepteurs FGFs, induit la prolifération des myoblastes et leur migration dans les bourgeons des membres (Buckingham *et al.*, 2003).

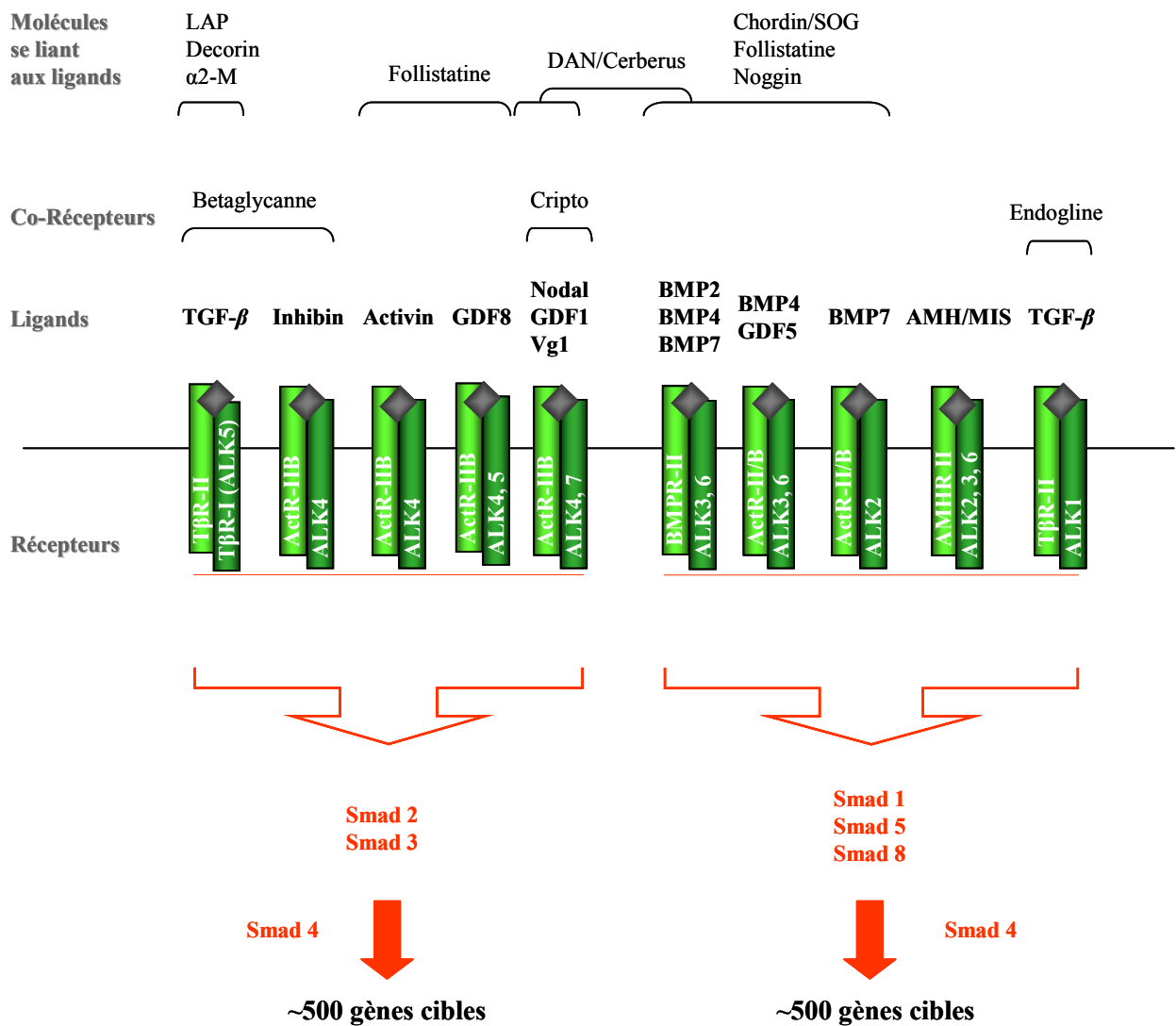


Figure 15 : Représentation schématique des interactions possibles entre les ligands de la superfamille des TGF- β s, leurs molécules de liaison, les co-récepteurs et les récepteurs de type I et de type II, chez les Vertébrés.

Les R-Smads 1, 2, 3, 5 et 8 représentés en dessous, sont groupés en fonction de leur spécificité de signalisation. Les autres noms utilisés couramment sont: ALK2/ActR-I, ALK3/BMPR-IA, ALK4/ActR-IB, ALK5/TBR-I et ALK6/BMPR-IB.

(D'après Shi et Massagué, 2003).

Leur puissant effet inhibiteur sur la différenciation des cellules myogéniques, passe par la répression de l'expression des marqueurs tardifs de la différenciation et par le contrôle de l'activité des facteurs myogéniques (Tortorella *et al.*, 2001), en induisant leur activation par les protéines kinases AMPc dépendantes et par les protéines kinases C. Ces facteurs, impliqués dans de nombreuses interactions tissulaires, sont exprimés par de nombreux tissus, à l'exception de FGF6, dont l'expression est restreinte au tissu musculaire en développement (de Lapeyrière *et al.*, 1993). Leur expression diminue au cours de la différenciation, à cause en partie, de la disparition et de la perte de régulation de leurs récepteurs de surface après la fusion.

Les bFGFs sont les membres de cette famille les plus largement distribués et également les plus compétents pour l'inhibition de la différenciation des cellules musculaires (Florini *et al.*, 1991). *In vitro*, bFGF est un puissant mitogène pour les myoblastes et il réprime le démarrage de la différenciation terminale. Il est aussi capable d'annuler l'effet positif de IGF-I sur la différenciation des cellules C2C12 en cultures (Tortorella *et al.*, 2001). Stern *et al.*, (1997) ont décrit que bFGF et TGF- β 1 agissaient en synergie pour promouvoir la myogenèse du mésoderme paraxial en stimulant la prolifération et/ou la survie des myoblastes et pré-myoblastes. Enfin, bFGF a été impliqué dans le contrôle de l'expression des transcrits *myogénine* et *myoD*, alors que, Myf5 et MyoD, en synergie avec GATA, activent la transcription de FGF-4 en se fixant sur une boîte E (Iwahori *et al.*, 2004).

IV.2.3. Superfamille des Transforming Growth Factor β (TGF- β s).

Plus de quarante membres ont été identifiés dans cette superfamille, qui peut être subdivisée en deux sous-familles majeures : les TGF- β /Activines/Nodal et les BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)/GDF (*Growth and Diffenciation Factor*)/MIS (*Muellerian inhibiting substance*). Ces différents facteurs sont regroupés sur la base de leur homologie de séquence et sur la spécificité de la voie de signalisation qu'ils activent. Ces ligands partagent un grand nombre de récepteurs, dont les arrangements induiront différentes voies de signalisation (Figure 15). Cette superfamille des TGF- β s joue un rôle très important dans les stades précoces de l'embryogenèse, et dans le maintien de l'homéostasie des tissus adultes, en régulant la croissance et la différenciation cellulaires, ainsi que l'apoptose (Shi and Massague, 2003).

Dans ce chapitre, nous décrirons de manière générale les caractéristiques de cette superfamille, en détaillant plus particulièrement, la myostatine (GDF-8, *Growth*

Differentiation Factor-8), un ligand appartenant à la première sous-famille, le récepteur ActRIIB (Activin Receptor type IIB), un membre de la famille des récepteurs des TGF- β s, et la follistatine, une protéine inhibitrice de plusieurs ligands de cette superfamille.

IV.2.3.1. Les ligands de la superfamille des TGF- β s.

IV.2.3.1.1. Famille des TGF- β s.

Chez les mammifères, trois isoformes sont répertoriées: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, et deux autres sont décrites mais uniquement chez le poulet et le xénope: TGF- β 4 et TGF- β 5, respectivement (Sporn and Roberts, 1991).

In vivo, les TGF- β 1, - β 2, - β 3 sont potentiellement impliqués dans le développement myogénique du tube neural (Stern *et al.*, 1997) avec une régulation spatio-temporelle caractérisée par une forte expression de ces trois facteurs pendant les phases de prolifération mais aussi pendant les phases de différenciation, à l'exception de TGF- β 1. Les TGF- β s sont en fait des inhibiteurs de la différenciation myogénique. Ils bloquent de nombreuses étapes comme la fusion, l'augmentation de l'activité de la créatine kinase ou encore, l'accumulation de protéines spécifiques du muscle. Cette inhibition est réversible si l'on retire ces facteurs du milieu, et comme pour les FGFs, les cellules différenciées ne répondent plus à leur stimulation à cause d'une diminution du nombre de récepteurs de surface et de l'affinité des ligands pour ces récepteurs. Aussi, des études indiquent que la différenciation des myoblastes en culture induite par les TGF- β s, est dépendante de la concentration en sérum des milieux, puisque elle est inhibée en milieu appauvri, et activée en milieu enrichi (Zentella and Massague, 1992).

Les mécanismes par lesquels les TGF- β s inhibent la différenciation passent par exemple, par l'induction ou la répression de l'expression de protéines du cycle cellulaire, ou par l'induction des proto-oncogènes *c-fos*, *c-jun* et *JunB*. Les TGF- β s inhibent aussi l'expression de facteurs myogéniques, et notamment l'activité du facteur de transcription MEF2 en le séquestrant dans le cytoplasme.

In vitro, les TGF- β s peuvent induire et stimuler la myogenèse dans les somites lorsqu'ils sont associés à d'autres facteurs de croissance. Stern *et al.*, (1997) ont montré que TGF- β 1 plus bFGF induisent la myogenèse du mésoderme paraxial, soit en augmentant la prolifération des myoblastes, soit en favorisant leur survie. Pirskanen *et al.*, (2000) ont montré

une action de ces deux facteurs avec l'Insuline et les IGFs sur l'induction de la myogenèse dans les somites, la prolifération des cellules et l'inhibition de l'apoptose.

IV.2.3.1.2. Famille des BMPs.

La famille des BMPs comprend plus de trente membres. Ce sont des protéines sécrétées, identifiées dans la formation et la régulation du tissu osseux, mais qui présentent d'autres fonctions importantes pendant le développement de l'embryon. Elles ont des rôles déterminants dans l'induction des interactions pendant l'embryogenèse chez les vertébrés et les invertébrés.

Dans la myogenèse, le plus étudié est BMP4. Il est exprimé dans le tube neural et inhibe le développement du myotome (Pourquie *et al.*, 1996). Il réprime l'activation des facteurs myogéniques et maintient l'expression du gène *Pax3* qui lui réprime la différenciation des myoblastes au cours de leur migration. Chez la Drosophile, *ddp* (*decapentaplegic*) qui code pour l'homologue de BMP2 et BMP4, est impliqué dans la spécialisation des cellules le long de l'axe dorso-ventral pendant l'embryogenèse. Plus récemment, GDF-11 (ou BMP11) a été identifié et interviendrait dans la régulation de la mise en place du squelette axial (Gamer *et al.*, 2001) en inhibant l'expression de *Pax3* et de *myoD*. Ce facteur présente 90% d'homologie de séquence avec la myostatine, qui n'appartient à aucune des familles citées précédemment.

IV.2.3.1.3. Famille des Activines.

Les Activines sont des facteurs de croissance et de différenciation produits par de nombreux types cellulaires et de multiples tissus, sur lesquels ils agissent également (Zimmerman and Mathews, 2001). Elles ont été identifiées comme des protéines régulant l'action de la FSH (*Follicule-Stimulating Hormone*) dans les gonades, mais sont aussi impliquées dans d'autres processus biologiques: la survie des cellules neuronales, l'induction du mésoderme dans les embryons de Xénope et l'ostéogenèse. La capacité des Activines à exercer ces diverses fonctions est liée à leur capacité à stimuler et à réprimer l'expression de nombreux gènes, à leurs effets prolifératifs et anti-prolifératifs, et aussi à leurs activités de différenciation cellulaire.

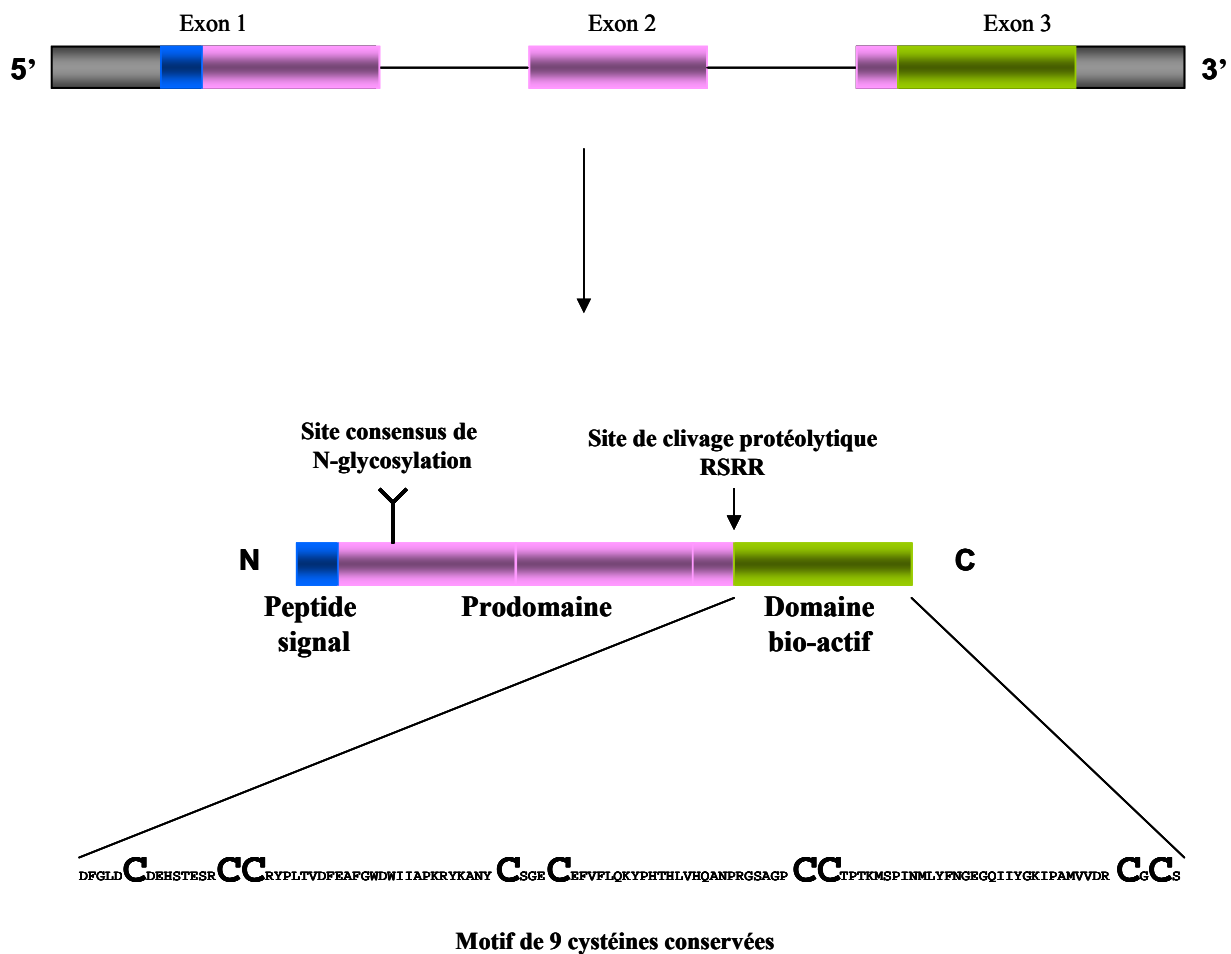


Figure 16 : Représentation schématique du gène codant pour la myostatine, et de sa structure protéique.

Le gène codant pour la myostatine est constitué de trois exons et de deux introns. Le début de l'exon 1 codera pour le peptide signal (en bleu) de la protéine, la fin de l'exon 1, l'exon 2 et le début de l'exon 3 coderont pour le prodomaine de la protéine (en rose), et la majeure partie de l'exon 3 codera pour le domaine bio-actif de la protéine (en vert). La structure protéique de la myostatine est caractéristique des membres de la superfamille des TGF- β s: un peptide signal, un site de clivage protéolytique RSRR et neuf résidus cystéine très conservés. Un site de N-glycosylation est également présent dans le prodomaine.

La protéine précurseur murine a une taille d'environ 52 kDa et la protéine mature monomérique, 15 kDa (McPherron *et al.*, 1997).

Cette famille est constituée de trois activines, les activines -A, -B et -AB résultants de la dimérisation de deux monomères, βA et βB , reliés par un pont disulfure. Ces deux sous unités sont exprimées chez l'embryon et chez l'adulte. Les Inhibines sont des protéines antagonistes des activines dans de nombreuses fonctions. Ce sont des hétérodimères constitués d'une sous unité α associée à βA (inhibine A) ou à βB (inhibine B), reliées elles aussi par un pont disulfure.

Deux protéines de liaison à l'activine et/ou à l'inhibine existent, $\alpha 2$ -Macroglobuline ($\alpha 2$ -M) et la follistatine, $\alpha 2$ -M liant l'activine avec beaucoup moins d'affinité que la follistatine et les récepteurs de surface.

IV.2.3.1.4. La myostatine (GDF-8).

La myostatine ou GDF-8 (*Growth Differentiation Factor-8*), est un nouveau membre de la superfamille des TGF- β s, décrit pour la première fois en 1997 par l'équipe de McPherron et ses collaborateurs et qui joue un rôle prépondérant dans la régulation de la croissance musculaire. Son inactivation, naturelle ou expérimentale, provoque une augmentation du poids des animaux liée spécifiquement à une augmentation de leur masse en muscle squelettique, et sa sur-expression, une atrophie musculaire. L'étude de la myostatine, et plus particulièrement sa voie de signalisation, devrait conduire à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires liés à l'hypertrophie musculaire chez le bovin.

IV.2.3.1.4.1. Conservation de la séquence peptidique.

Chez l'homme (Ferrell *et al.*, 1999; Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998) et le bovin (Charlier *et al.*, 1995), le gène codant la myostatine est localisé sur le chromosome 2, tandis que chez le porc (Sonstegard *et al.*, 1998) et la souris (Szabo *et al.*, 1998), il se situe sur les chromosomes 15 et 1, respectivement. Le gène codant la myostatine, est constitué de trois exons et deux introns (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998; Jeanplong *et al.*, 2001), l'exon trois codant pour le domaine bioactif de la protéine mature (Figure 16). Sa séquence, fortement conservée à travers les espèces (McPherron *et al.*, 1997), suggère que la fonction de la myostatine s'est aussi conservée. Remarquablement, la séquence du peptide actif est identique à 100% chez l'homme, le rat, la souris, la poule, la dinde et le porc, et les séquences

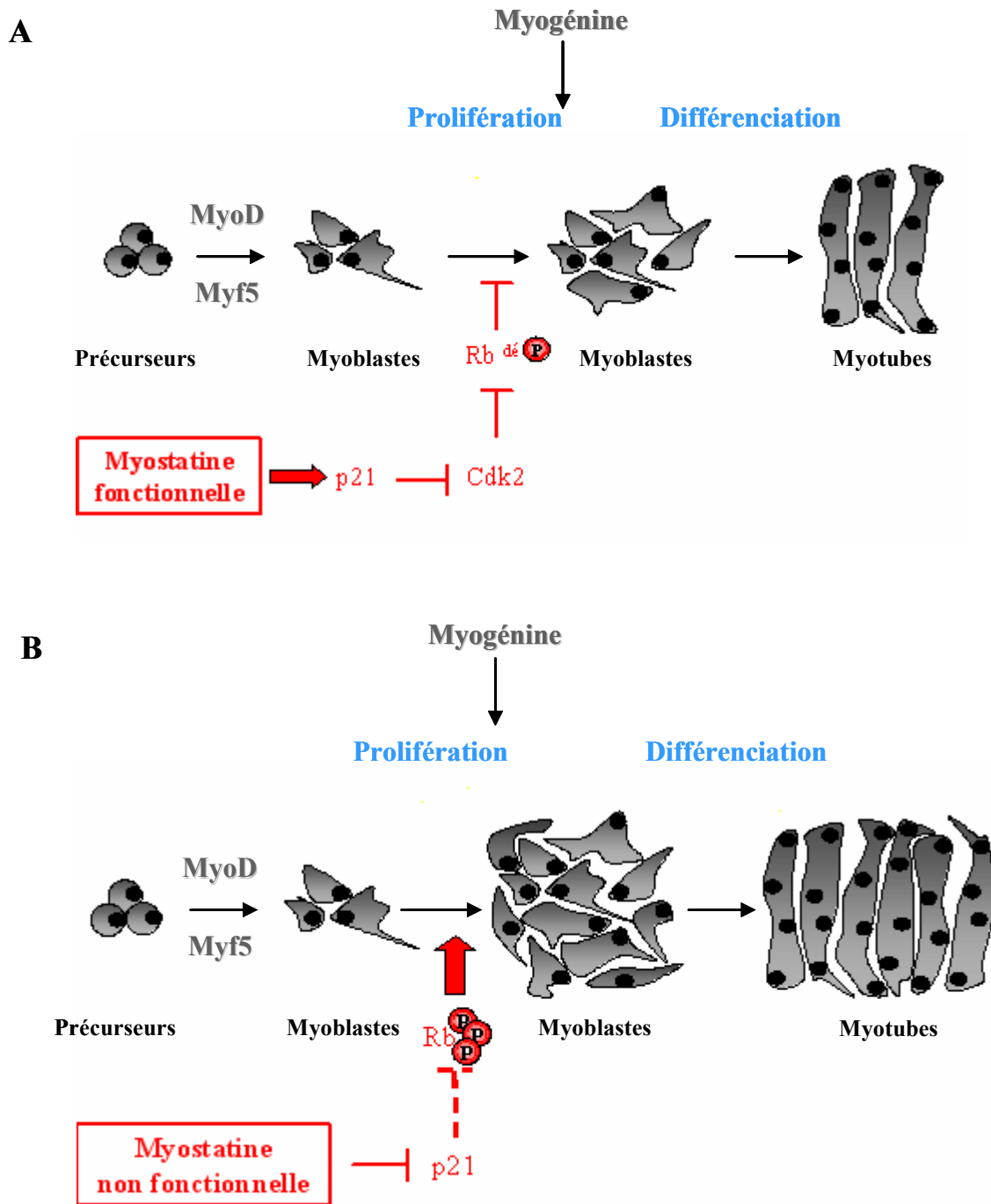


Figure 17 : Inhibition de la prolifération des cellules musculaires par la myostatine.

La myostatine recombinante, ajoutée sur des myoblastes C2C12 en culture, augmente l'expression du facteur de transcription p21, ce qui provoque une diminution du taux intracellulaire et de l'activité de Cdk2, et une diminution de la phosphorylation de Rb. En conséquence, la prolifération reste bloquée en phase G1, et les myoblastes se différencient (A). En l'absence de myostatine fonctionnelle, les protéines Rb sont dans un état hyperphosphorylé, ce qui provoque une prolifération exacerbée des myoblastes et une augmentation du nombre des fibres musculaires (B).

(D'après Thomas *et al.*, 2001).

protéiques bovine, ovine et du babouin, contiennent seulement un à trois acides aminés différents dans la protéine mature.

IV.2.3.1.4.2. Expression spatio-temporelle, *in vivo*.

La myostatine est détectée très tôt au cours du développement fœtal, dès 9.5 jours *post-coïtum* chez la souris, dans les cellules précurseurs myogéniques, au niveau du compartiment myotomal des somites (McPherron *et al.*, 1997). Chez le bovin, elle est faiblement détectée à 16 jours de gestation puis augmente dès 30 jours de vie fœtale (Kambadur *et al.*, 1997). A des stades plus tardifs du développement et à l'âge adulte, les premières études montraient une expression restreinte dans les muscles squelettiques, et pratiquement indétectables dans les autres tissus (McPherron *et al.*, 1997). Cependant d'autres auteurs ont observé une faible expression de la myostatine dans les myocytes cardiaques de mouton et de souris, particulièrement après un infarctus du myocarde (Sharma *et al.*, 1999), dans les glandes mammaires de truie en lactation (Ji *et al.*, 1998), dans le tissu adipeux de souris (McPherron *et al.*, 1997), ainsi que dans le cerveau et le tissu ovarien (Roberts and Goetz, 2001). Chez la souris, l'expression des transcrits de myostatine a été détectée dans les fibres musculaires rapides de type II du muscle *Gastrocnémius* (Carlson *et al.*, 1999), alors que chez le rat et l'homme, elle est localisée dans tous les types de fibres (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998; Kirk *et al.*, 2000).

IV.2.3.1.4.3. Rôle de la myostatine, *in vitro*.

Dans des cultures de cellules C2C12, la sur-expression ou l'ajout de myostatine inhibe la prolifération des myoblastes (Taylor *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2000) et leur différenciation en myotubes (Artaza *et al.*, 2002). Cette surexpression protège également les myoblastes de l'apoptose (Joulia *et al.*, 2003). Par contre, l'inhibition de la myostatine endogène stimule la prolifération et la différenciation des cellules musculaires et augmente le taux de mort cellulaire (Joulia *et al.*, 2003). En fait, la myostatine régule la progression des myoblastes dans le cycle cellulaire en contrôlant les transitions des phase G₁-S et G₂-M (Thomas *et al.*, 2000). En effet, dans des culture de myoblastes C2C12 traités par de la myostatine recombinante, on observe une augmentation du taux intracellulaire du facteur de transcription p21 accompagné d'une diminution du taux intracellulaire et de l'activité de Cdk2 (Figure 17). Le complexe cyclineE/Cdk2 devient alors inactif et la phosphorylation de Rb est supprimée. En conséquence, la prolifération reste bloquée en phase G₁, le cycle

cellulaire s'arrête et les myoblastes se différencient. Par conséquent, en l'absence de myostatine fonctionnelle, la protéine Rb se trouve dans un état hyperphosphorylé, et les myoblastes continuent de proliférer. Cette prolifération exacerbée provoque une augmentation du nombre des fibres musculaires (Thomas *et al.*, 2000) (Figure 17).

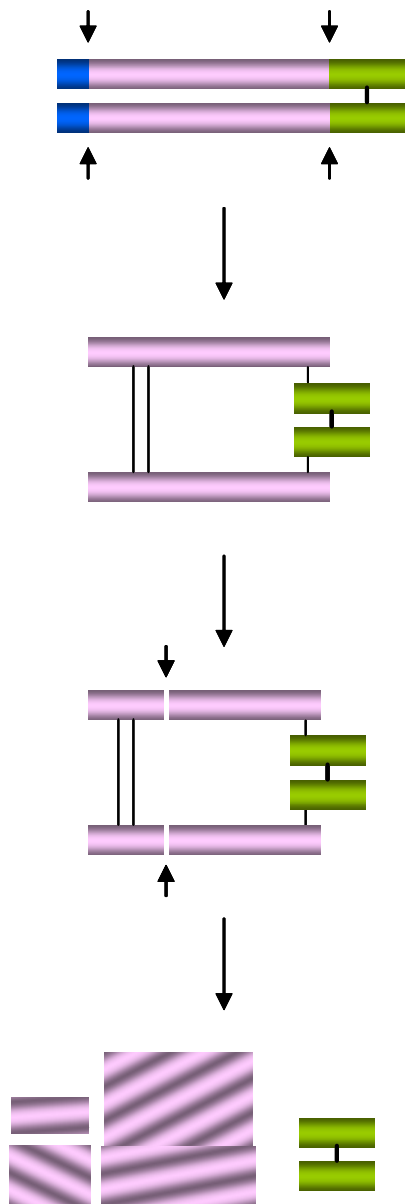
L'accumulation des myoblastes en phase G₂ induite par la myostatine n'est pas encore bien comprise, cependant p21 a déjà été mis en évidence dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₂. Récemment, des auteurs ont mis en évidence une hypothétique association entre la myostatine et le facteur de transcription p27 (Lin *et al.*, 2002). Ils ont montré que l'augmentation de la masse corporelle chez des souris p27^{-/-} était liée en partie à une diminution du taux intramusculaire de myostatine.

IV.2.3.1.4.4. La myostatine et les facteurs myogéniques.

L'action inhibitrice de la myostatine est également accompagnée d'une dérégulation des facteurs de transcription. La Myogénine est une cible importante de la myostatine endogène dans des cellules C2C12 en culture (Jouliat *et al.*, 2003), et sa surexpression diminue le taux et la phosphorylation du facteur myogénique MyoD. De plus, sachant que la Myogénine est surexprimée dans des cellules myogéniques stimulées par IGF-I (Florini *et al.*, 1996), et que la région promotrice des gènes humain (Ferrell *et al.*, 1999) et bovin (Jeanplong *et al.*, 2001) contient des éléments de séquence permettant la liaison des facteurs de transcription MyoD (« boîtes E ») et MEF2C, IGF-I pourrait indirectement modifier l'expression de la myostatine *via* les facteurs de transcription (Kirk *et al.*, 2000). Toutefois, l'expression de la myostatine pourrait aussi être régulée par les cytokines et les facteurs de croissance, puisque des séquences consensus de fixation de ces éléments ont été détectées dans la région promotrice du gène bovin (Jeanplong *et al.*, 2001).

IV.2.3.1.4.5. La myostatine dans le processus de régénération musculaire.

La surexpression de myostatine est aussi observée dans les processus de régénération musculaire. Elle a été détectée dans les myocytes cardiaques bordant la région d'un infarctus (Sharma *et al.*, 1999), et dans les zones de régénération du tissu musculaire squelettique, où les cellules satellites activées prolifèrent (Yamanouchi *et al.*, 2000). Cette surexpression est aussi observée dans des cellules non myogéniques situées au niveau d'une lésion, tels que les fibroblastes. L'implication des facteurs de croissance IGFs, HGFs et TGF- β s dans la régénération du tissu musculaire squelettique a déjà été décrite, et l'action inhibitrice de la



La myostatine, synthétisée sous forme d'un précurseur, subit deux clivages protéolytiques (flèches noires): l'un permet la libération du peptide signal (en bleu), l'autre génère le fragment C-terminal (en vert), qui possède l'activité biologique et l'activité de liaison au récepteur.

Suite au second clivage protéolytique, le propeptide (en rose), et le dimère C-terminal lié par un pont disulfure (en gris), restent liés de manière non covalente, et forment un complexe latent.

La forme latente de la myostatine peut être activée par certaines métalloprotéinases de la famille des BMP-1/tolloid, qui clivent le propeptide, provoquant la dissociation du complexe latent propeptide/dimère actif.

Le dimère C-terminal libéré devient actif, et peut se fixer sur le récepteur afin d'activer une cascade de signalisation intracellulaire.

Figure 18 : Représentation schématique de la biosynthèse de la myostatine.

Comme les autres membres de la famille des TGF- β s, la myostatine est synthétisée sous forme d'un précurseur protéique, qui subit deux clivages protéolytiques afin de générer la molécule biologique active (McPherron *et al.*, 1997).

myostatine sur la prolifération et/ou la différenciation des cellules satellites pourrait jouer un rôle important dans le processus de régénération, en contrebalançant l'action de ces facteurs. Aussi, l'expression de myostatine revient à un niveau basal quand la lésion du tissu est réparée (Conlon and Raff, 1999), et la taille du muscle régénéré n'excède jamais sa taille originale. Ces observations ont permis à certains auteurs de qualifier la myostatine de protéine chalone (Lee and McPherron, 1999), spécifique du muscle squelettique. Cette hypothèse est appuyée par le changement d'expression de myostatine lié à la perte de masse musculaire observée dans l'atrophie du muscle squelettique (Zimmers *et al.*, 2002).

IV.2.3.2. Structure générale des ligands de la superfamille des TGF- β s.

Les différents membres de la superfamille des TGF- β s partagent plusieurs caractéristiques structurales :

- un groupement d'acides aminés hydrophobes dans la partie N-terminale qui constitue le signal de sécrétion
- une séquence consensus RXXR dans la partie C-terminale qui permet de libérer la partie bio-active de la protéine précurseur
- dans la partie C-terminale, six à neuf résidus cystéine très conservés en nombre et en positionnement dans la séquence, qui forment des ponts disulfures inter et intrachaines, et qui facilitent la formation d'un « corps cystéine »

Deux sites de clivage sont donc présents et nécessaires pour la libération de la protéine active. Le premier permet l'élimination du peptide signal et la libération de la protéine précurseur dans la lumière du réticulum endoplasmique. Chaque membre de cette famille est en effet synthétisé sous forme d'une protéine inactive caractérisée par un pro-domaine et une partie bio-active proprement dite. Ce clivage, réalisé par des protéases de la famille des subtilisines telle que la furine, a lieu dans l'appareil de Golgi, après la dimérisation de la protéine mature. Le pro-domaine représente environ 70% de la protéine précurseur et possède plusieurs fonctions importantes. Il a un rôle majeur dans le repliement et la dimérisation de la protéine, mais aussi dans le transport de la protéine active sécrétée (Figure 18).

IV.2.3.3. Les récepteurs de la famille des TGF- β s.

Les récepteurs de la famille des TGF- β s sont des récepteurs à Sérine/Thréonine kinases, dont 12 membres ont été identifiés chez l'homme : 7 sont de type I, ALK1 à ALK7 (*Activin-like Kinase*) et 5 sont de type II, T β R-II (*TGF- β Receptor type II*), ActRII et ActRIIB

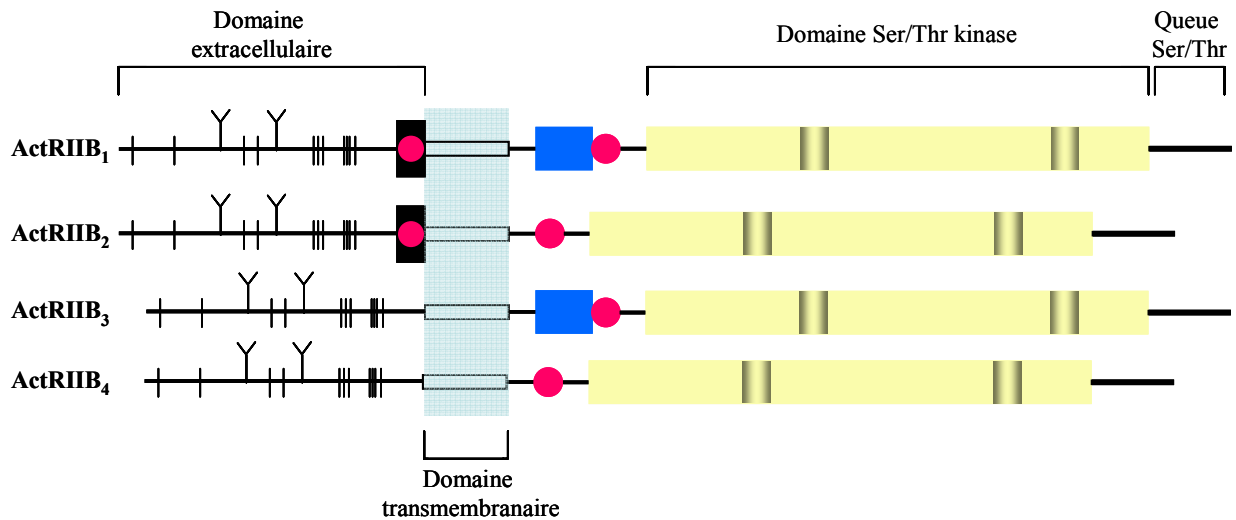


Figure 19: Représentation schématique des 4 isoformes murines de la protéine ActRIIB₂

Sont représentées les régions épissées: les boîtes bleues et noires, les régions riches en prolines (ronds rouges) ainsi que les 11 cystéines extracellulaires (barres verticales), les 2 sites potentiels de glycosylation (barres surmontées d'un V), la région transmembranaire, le domaine sérine/thréonine Kinase avec les 2 inserts caractéristiques et la queue C-terminale riche en sérine et thréonine.

(D'après Attisano *et al.*, 1992)

(*Activin Receptor type II et IIB*), BMPR-II (*Bone Morphogenetic Protein Receptor II*) et AMHR-II (*Anti Mullerian Hormone Receptor II*) (Figure 15). Ces deux sous unités réceptrices sont constituées de 500 acides aminés environ, organisés en trois parties : un domaine N-terminal extracellulaire pour la fixation des ligands, une région transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire, à Ser/Thr Kinases.

Le récepteur de type I contient une séquence caractéristique SGSGSG, appelée domaine GS, situé en position N-terminale du domaine kinase. Ce domaine est une succession de résidus Sérine et Glycine qui seront phosphorylés par le récepteur de type II pour permettre l'activation du récepteur de type I.

IV.2.3.3.1. Les récepteurs de type II des Activines.

IV.2.3.3.1.1. Structure.

Deux récepteurs de type II (Zimmerman and Mathews, 2001) existent dans la famille des Activines, ActRII et ActRIIB. Structuralement ils se ressemblent avec 51% d'identité protéique dans la partie extracellulaire, 42% dans la partie transmembranaire et 75% dans la partie intracytoplasmique (Attisano *et al.*, 1992), mais ils diffèrent significativement au niveau de leur structure primaire et de leur affinité pour l'activine A. Dans la partie N-terminale, ils possèdent deux sites de N-glycosylation et un motif de dix résidus cystéine très conservé près de la région transmembranaire. Ces deux récepteurs partagent aussi une extrémité C-terminale riche en résidus sérine et thréonine qui sont des sites potentiels d'autophosphorylation. Sous la membrane, une région riche en résidus proline est également présente qui ressemble aux domaines SH3 (*Src-homology 3*). Ce sont des sites d'interactions possibles avec d'autres molécules intracellulaires.

IV.2.3.3.1.2. Isoformes protéiques.

Quatre isoformes du récepteur ActRIIB (Figure 19) issues d'un épissage alternatif ont été clonées chez la souris (Attisano *et al.*, 1992). Deux formes diffèrent entre elles par l'épissage d'un segment situé dans un cluster de résidus proline juste avant la région transmembranaire. Deux autres résultent de l'épissage d'une région située entre la région transmembranaire et le domaine kinase.

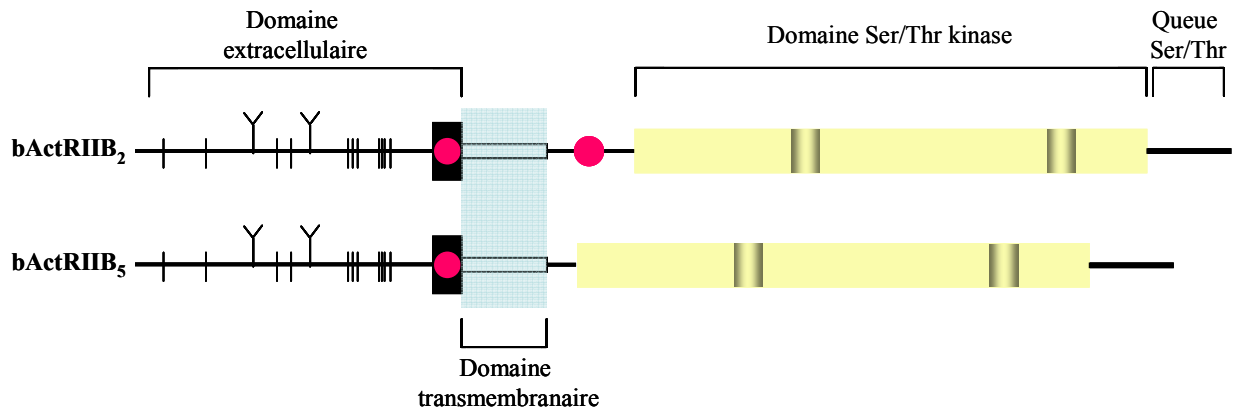


Figure 20 : Représentation schématique des 2 isoformes bovines de la protéine ActRIIB: bActRIIB2 et bActRIIB5 (par analogie avec les isoformes murines).

La région épissée par épissage alternatif est une région riche en prolines sous-membranaire, représentée par (ronds rouges). Sont indiqués également, les 11 cystéines extracellulaires (barres verticales), les 2 sites potentiels de glycosylation (barres surmontées d'un V), la région transmembranaire, le domaine sérine/thréonine Kinase avec les 2 inserts caractéristiques et la queue C-terminale riche en sérine et thréonine.

(D'après Ethier *et al.*, 1997)

Chez le bovin (Ethier *et al.*, 1997), deux autres isoformes de ce récepteur ont été clonées (Figure 20), qui résultent de l'épissage alternatif de 42 nucléotides qui codent pour 14 acides aminés, dont la majorité sont des résidus Proline, situés sous la région transmembranaire. Ces auteurs ont également montré que cette région qui ressemble à des domaines de liaison SH3, interagit avec deux protéines de 69 kDa et 71 kDa dans une lignée de cellules de l'endomètre utérin. Une seule isoforme de ce récepteur a été détectée chez le rat et l'homme (Hilden *et al.*, 1994; Legerski *et al.*, 1992).

IV.2.3.3.1.3. Mode d'activation.

Les récepteurs sérine/thréonine kinase de type I et II forment des complexes hétérotétramériques liés de manière non covalente à la surface des cellules (Mathews and Vale, 1993). Différentes expériences ont montré que les deux types de récepteurs sont indispensables à la signalisation intracellulaire induite par la fixation d'un ligand (Attisano *et al.*, 1996; Willis *et al.*, 1996). On ne sait pas très bien si ces complexes sont préformés dans la membrane plasmique avant la fixation du ligand ou s'ils sont formés à partir de sous unités I et II de récepteurs indépendantes qui sont recrutées en réponse à un ligand spécifique. Cependant, Attisano *et al.*, (1996) ont montré que la co-expression de ActRIIB et ALK-4 conduit à la formation d'un complexe actif en l'absence de ligand, mais que néanmoins la présence du ligand facilite la formation du complexe, la phosphorylation du récepteur de type I et l'activation de la cascade de signalisation intracellulaire.

La phosphorylation joue un rôle prépondérant dans l'activation du récepteur. Des études biochimiques pour caractériser les récepteurs de type II ont été réalisées, et ont indiqué que ces molécules sont constitutivement phosphorylées sur des résidus sérine, à cause en partie, d'une autophosphorylation (Attisano *et al.*, 1996; Willis *et al.*, 1996; Zimmerman and Mathews, 2001). La surexpression d'ActRIIB seul ou avec des récepteurs de type I, produit la même quantité de récepteurs de type II phosphorylés, avec ou sans stimulation par l'activine, les motifs phosphorylés étant identiques dans chaque situation. L'activité d'autophosphorylation des récepteurs de type II n'est donc pas régulée par le ligand et le récepteur de type I, ces récepteurs pouvant également être phosphorylés par d'autres kinases sérine/thréonine intracellulaires.

L'état de phosphorylation des récepteurs de type I a été analysé *in vivo* par surexpression de ces récepteurs dans des cellules de mammifères. Il semblerait que ces derniers se trouvent dans un état d'hypophosphorylation quand ils sont exprimés seuls ou

avec les récepteurs de type II, et que l'ajout de ligand augmente rapidement leur état de phosphorylation. De plus, quand ils sont co-exprimés avec un récepteur de type II mutant ce niveau basal de phosphorylation reste inchangé. Le récepteur de type I est donc le substrat direct de l'activité kinase du récepteur de type II (Attisano *et al.*, 1996; Zimmerman and Mathews, 2001).

IV.2.3.3.1.4. Expression et fonction du récepteur ActRIIB dans l'embryogenèse.

Pendant l'embryogenèse, ActRIIB est exprimé au niveau de l'épiblaste des embryons de souris en pré-gastrulation, de l'ectoderme embryonnaire et dans plusieurs tissus durant l'organogenèse, comme le cerveau, la moelle épinière, l'estomac et l'intestin (Pierson and Matzuk, 2001). De nombreuses expérimentations ont élucidé le rôle d'ActRIIB pendant cette période. La surexpression d'une forme tronquée de ce récepteur bloque la formation du mésoderme induite par l'activine, tandis que des injections de ce récepteur tronqué dans la partie dorsale gauche de blastomères de Xénope au stade 16 cellules, établit au hasard un cœur d'embryon. De plus, des souris délétées pour le gène *ACVR2B* meurent à la naissance à cause de graves malformations cardiovasculaires et congénitales.

ActRIIB semble donc être un régulateur vital du développement de la souris, avec un rôle majeur dans l'initiation de l'axe gauche-droite et de l'organogenèse (Pierson and Matzuk, 2001). Ces résultats sont contraires aux données requises chez des souris délétées pour le gène codant l'activine (Matzuk *et al.*, 1995), ce qui indique que d'autres ligands doivent interagir avec ce récepteur. Chez les mammifères, nodal et les peptides similaires à nodal sont les ligands qui semblent le plus interagir avec ActRIIB durant les stades précoces de l'embryogenèse. ActRIIB est aussi un récepteur fonctionnel pour les ligands BMP-2 et BMP-7. Kusumegi *et al.*, (2004) ont montré que le complexe ActRIIB/BMP-7 est impliqué dans la régulation de l'apoptose des cellules de l'endomètre. Récemment, ActRIIB a été identifié comme le récepteur de la myostatine (Rebbapragada *et al.*, 2003).

IV.2.3.3.1.5. ActRIIB et la myostatine.

La cascade de signalisation de la myostatine utilise la voie des TGF- β s/Activines/Nodal, en se fixant et en activant un complexe de récepteurs, composé d'un dimère de récepteurs de type II, ActRIIB (Lee and McPherron, 2001; Rebbapragada *et al.*, 2003; Thies *et al.*, 2001), associé à un dimère de récepteur de type I, ALK4 ou ALK5 (Rebbapragada *et al.*, 2003) (Figure 23). Ce récepteur hétérotrétramérique activé recrute Smad

2 ou Smad 3 qui se complexe avec Smad 4 et est transloqué dans le noyau pour activer ou réprimer la transcription de gènes spécifiques. Récemment, Zhu *et al.*, (2004) ont montré que seul l'inhibiteur Smad 7 régule négativement la transcription induite par la myostatine, et que cette boucle de rétrocontrôle négative est induite par la myostatine elle-même via Smad 2, Smad 3 et Smad 4.

IV.2.3.4. Voies de signalisation des membres de la superfamille des TGF- β s.

Les membres de la superfamille des TGF- β s débutent leur cascade de signalisation en induisant la formation d'un complexe de récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinases, qui activera ensuite les facteurs de transcription Smad (Shi and Massague, 2003) (Figure 15).

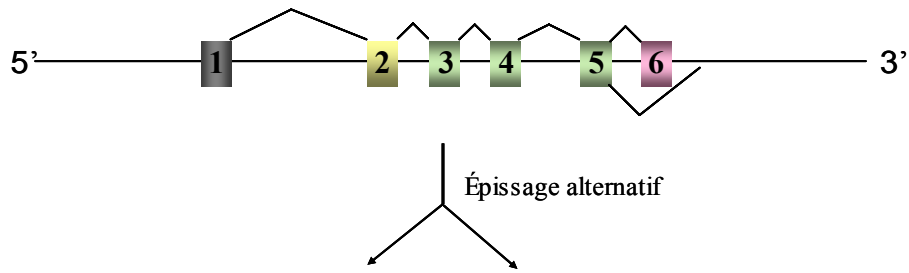
IV.2.3.4.1. Mécanismes de liaison du ligand aux récepteurs.

Deux modes distincts d'interaction entre le ligand et le récepteur existent. Les membres de la sous-famille des BMPs présentent une grande affinité pour le domaine extracellulaire des récepteurs de type I, et une faible affinité pour les récepteurs de type II. Les ligands de cette sous-famille se fixent donc d'abord sur les récepteurs de type I, et ce complexe préassemblé, à une affinité augmentée vis-à-vis du récepteur de type II. Par contre, les ligands TGF- β s et Activine, présentent une haute affinité pour les récepteurs de type II, et n'interagissent jamais avec les récepteurs de type I isolés. Dans ce cas, la liaison du ligand avec le récepteur de type II permet le recrutement du récepteur de type I, pour former un large complexe constitué d'un ligand sous forme dimérique et de quatre molécules de récepteurs.

IV.2.3.4.2. Contrôle des interactions ligand/récepteurs.

L'accès des ligands aux récepteurs est très contrôlé, et plusieurs molécules régulatrices sont identifiées (Figure 15). Le pro-peptide ou LAP (*Latency-Associated Protein*) se lie de façon non covalente au peptide mature TGF- β , assurant ainsi son transport et empêchant sa fixation au récepteur. L'Inhibine inhibe spécifiquement l'activité des Activines (Phillips, D.J. *et al.*, 2001; Phillips, D. J. and de Kretser, 1998), et Noggin et Chordin, celle des BMPs. La follistatine et une protéine apparentée, FLRG (*follistatin-related gene*) (Nakatani *et al.*, 2002) régulent la fixation de plusieurs ligands : les Activines, les BMPs et GDF-8 (Hill *et al.*, 2003; Lee and McPherron, 2001).

Gène *FST*



Précurseur 344



Précurseur 317



Follistatine 315



Follistatine 288



Follistatine 300/303

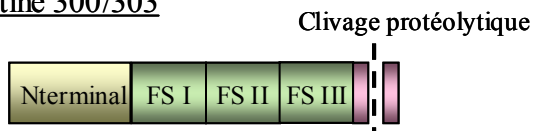


Figure 21: Représentation schématique du gène codant la follistatine et des mécanismes d'épissage alternatif et de clivage protéolytique donnant naissance aux formes protéiques majeures.

Nterminal: domaine N-terminal, FS I, II, III: domaines follistatine I, II, III. Chaque domaine protéique est codé par un exon, représentés par des couleurs identiques.

(D'après Phillips, DJ *et al.*, 2001)

La myostatine peut aussi être régulée par d'autres protéines, comme GAS-1 (*GDF-8-associated serum protein-1*) (Hill *et al.*, 2003) et son pro-peptide (Thies *et al.*, 2001). Récemment, Wang *et al.*, (2003) ont montré une interaction entre la région du peptide signal de GDF-8 et sHGT (*human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein*), une protéine exprimée de façon ubiquitaire chez l'homme, suggérant que cette dernière pourrait agir comme une protéine chaperonne en assistant la sécrétion et l'activation de GDF-8. Toutes ces protéines régulent négativement l'activité de la myostatine, *in vivo* et *in vitro*.

Il existe aussi des protéines ancrées à la membrane de surface qui vont faciliter la liaison du ligand sur son récepteur spécifique. Ce sont les protéoglycannes Bétaglycane, aussi appelés récepteurs de type III des TGF- β s.

IV.2.3.4.2.1 La follistatine.

IV.2.3.4.2.1.1. Origine.

La follistatine est une protéine essentielle à la vie ; des mutants pour le gène codant la follistatine meurent rapidement après la naissance (Zimmerman and Mathews, 2001). Elle fût découverte comme un inhibiteur de la sécrétion de l'hormone FSH et extraite pour la première fois de tissus ovariens de porc (Ueno *et al.*, 1987) et de bovin (Robertson *et al.*, 1987). La follistatine lie et neutralise l'activité biologique de l'activine en empêchant cette dernière de se fixer sur ses récepteurs (de Winter *et al.*, 1996), et les complexes activine/follistatine qui lient des protéoglycannes de surface sont internalisés et dégradés (Hashimoto *et al.*, 1997). Ce système autocrine/paracrine joue un rôle majeur dans la régulation de l'activine dans l'organogenèse durant le développement mais aussi chez l'adulte. La follistatine peut lier d'autres membres de la superfamille des TGF- β s: BMP-2, BMP-4, BMP-7 (Amthor *et al.*, 2002), GDF-11 (Gamer *et al.*, 2001) et la myostatine (Lee and McPherron, 2001).

IV.2.3.4.2.1.2. Organisation structurale.

La follistatine est un glycopeptide monomérique très conservé, avec 83% d'homologie entre les espèces étudiées, à savoir le poulet, le Xénope et les mammifères (espèces murine, bovine, porcine, équine, ovine, canine et le rat), ces derniers étant homologues à 95% (Phillips, D. J. and de Kretser, 1998). Le gène *FST* a une taille d'environ 6 kbases et est constitué de six exons, avec un site d'épissage alternatif qui génère deux isoformes majeures (Figure 21), une forme longue qui code une pré-protéine de 344 acides aminés, et une forme courte délétée de l'exon 6 qui code pour une pré-protéine de 317 acides aminés (Phillips, D.J.

et al., 2001; Phillips, D. J. and de Kretser, 1998). Les deux protéines matures correspondantes, après clivage du peptide signal sont formées de 315 acides aminés (FS-315) et 288 acides aminés (FS-288), respectivement. L'extrémité C-terminale de FS-315 est clivée *in vivo*, pour donner la forme prédominante de 300 acides aminés détectée dans le fluide folliculaire. Deux sites de N-glycosylation sont présents en position 95 et 259, dans les domaines I et III. Les transcrits codant FS-288 ne représentent que 5% des transcrits du gène *FST*, cependant FS-288 a une activité inhibitrice six à dix fois plus importante que FS-315 (Inouye *et al.*, 1992). D'un point de vue structural, la follistatine est constituée : d'un peptide signal de 26 acides aminés, d'un domaine N-terminal de 63 acides aminés, de trois modules follistatine de 73 à 75 acides aminés et d'un domaine C-terminal très acide, de 27 acides aminés, présents uniquement dans la forme FS-315 (Innis and Hyvonen, 2003; Sidis *et al.*, 2001). Chaque domaine distinct est codé par un exon, et chaque module follistatine contient 10 résidus cystéine caractéristiques des protéines de la matrice extracellulaire impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire. En ce qui concerne les relations structure-fonction, l'extrémité N-terminale représente le domaine de liaison à l'activine. Le site de liaison aux protéoglycannes de surface est localisé dans le premier module follistatine, au niveau d'une région d'interaction héparane-sulfate. La présence du domaine C-terminal diminue l'affinité de liaison à la surface des cellules de la protéine.

IV.2.3.4.2.1.3. Rôle de la follistatine dans l'embryogenèse.

La follistatine est détectée très tôt au cours de l'embryogenèse et bloque l'activine, BMP-4 et BMP-7, trois inducteurs du mésoderme, pour induire une spécification neurale dans l'embryon de souris (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997). En fait, elle agit de concert avec *noggin* et *chordin*, deux antagonistes de BMP-4 et BMP-7, pour bloquer les effets de ces stimulateurs mésodermiques sur les cellules ectodermiques dorsales, en faveur d'une spécification neurale. La follistatine semble également très impliquée dans la différenciation neurale au vu de son expression abondante dans les somites et le mésoderme paraxial (Albano *et al.*, 1994), suggérant un rôle important de cette protéine dans la segmentation du cerveau postérieur et dans la formation des somites. Au milieu de l'embryogenèse, la follistatine est exprimée dans de nombreux organes, généralement à proximité des cellules qui expriment les sous unités des Activines ou leurs récepteurs.

Récemment, Amthor *et al.*, (2004) ont comparé l'expression de la myostatine et de la follistatine au cours du développement musculaire du poulet, et ils observent ces deux facteurs à l'intérieur ou près des muscles en développement. En fait la myostatine est

exprimée au centre du myotome et du dermomyotome, alors que la follistatine est exprimée sur les bords du dermomyotome, là où une forte expression de *Pax-3* est observée, et où les cellules musculaires sont détectées. Ainsi la follistatine peut lever l'inhibition exercée par GDF-8 sur *Pax-3* et *MyoD*. Cette distribution est en accord avec les phénotypes observés chez les souris knockout pour ces deux gènes: une croissance musculaire excessive chez les souris myostatine *-/-*, et une hypotrophie chez les souris follistatine *-/-* (Lee and McPherron, 2001). La follistatine neutralise l'activité inhibitrice de la myostatine en se liant au dimère mature, et en inhibant sa liaison sur son récepteur ActRIIB (Lee and McPherron, 2001). Contrairement à l'activine, tous les domaines de la follistatine sont nécessaires à sa complexation avec la myostatine (Amthor *et al.*, 2004).

La follistatine antagonise également les effets inhibiteurs de BMP-2, -4, -7 et de l'activine sur le développement musculaire (Amthor *et al.*, 2002), mais en présence des BMPs, elle augmente la prolifération des cellules myogéniques et retarde leur différenciation. Ce résultat suggère que la follistatine pourrait agir pour présenter les BMPs aux cellules myogéniques à des concentrations qui permettraient la stimulation de la croissance du muscle embryonnaire. En effet, Armand *et al.*, (2003) ont montré que la follistatine pouvait agir comme un régulateur positif de la différenciation musculaire, en interagissant avec la myostatine afin de participer à l'élargissement des myotubes durant les phénomènes de régénération du muscle *Soleus* de la souris, après dénervation.

IV.2.2.4.3. Mécanismes d'activation des récepteurs.

La fixation du ligand sous forme dimérique, sur les domaines extracellulaires des deux types de récepteurs, va provoquer un changement conformationnel de la partie intracytoplasmique, ce qui facilite la phosphorylation des résidus sérine et thréonine, et l'activation du récepteur de type I. Le récepteur de type II phosphoryle alors les nombreux résidus Sérine et Thréonine situés dans la séquence du domaine GS du récepteur de type I, afin de l'activer. Ce segment, proche de la région kinase, est une répétition de résidus Glycine et Sérine, qui va masquer le domaine catalytique quand il n'est pas phosphorylé. Les récepteurs de type I activés, propagent le signal dans la cellule par phosphorylation des Smads.

L'activation des récepteurs est aussi contrôlée. La phosphorylation du domaine GS des récepteurs de type I est bloquée par les protéines FKBP12, qui se fixent sur ce domaine et stabilisent ainsi la conformation inactive. L'activation n'a lieu que lorsque le récepteur de

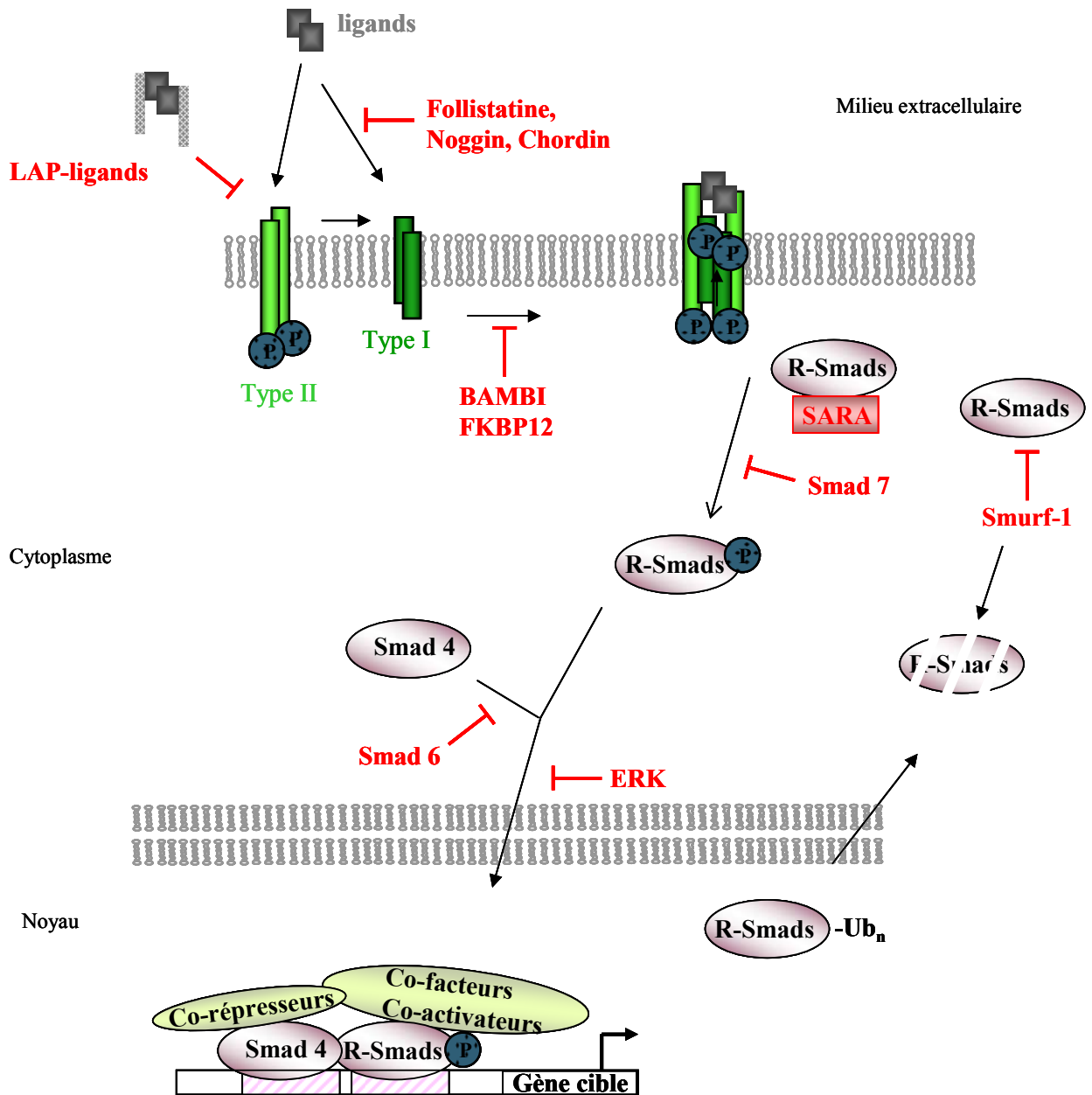


Figure 22 : Régulation de la voie de signalisation des membres de la superfamille des TGF-βs.

Différentes protéines inhibitrices interviennent: la follistatine, noggin, chordin et le propeptide (LAP) régulent la liaison du ligand sur le récepteur; BAMBI et FKBP12 régulent l'activation du récepteur; SARA, Smurf-1 et Smad 7 régulent la transmission du signal dans la cellule; ERK et Smad 6 régulent le passage des complexes R-Smad/Co-Smad dans le noyau.

(D'après Zimmerman et Padgett, 2000.)

type II phosphoryle le motif GS et libère FKBP12. Une autre molécule, BAMBI (*BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor*) exerce une inhibition sur l'activation du récepteur hétérotétramérique. Ayant une structure très proche de celle du récepteur de type I, il se dimérise avec ce dernier et empêche son activation.

IV.2.2.4.4. Voie de signalisation des Smads.

Les protéines Smads sont les seuls substrats connus des récepteurs de la superfamille des TGF- β s. Leur nom est issu de la contraction de MAD (*Mothers against decapentaplegic*) et SMA, les homologues des Smads chez la drosophile (*Mad*) et chez le ver *Caenorhabditis elegans* (*Sma*). Les Smads sont constitués de deux domaines globulaires conservés, MH1 et MH2 (*Mad homology 1* et *2*), reliée par une région « linker » plus divergente. MH1 est le domaine de liaison à l'ADN et MH2 le domaine de liaison aux autres Smads, et aux co-facteurs transcriptionnels (Massague and Wotton, 2000). Neuf protéines Smads sont identifiées chez les vertébrés (Shi and Massague, 2003):

- les R-Smads (*Receptor regulated Smads*) interagissent avec les sous-unités I du récepteur activé (Figure 22) qui les activent par phosphorylation. Les R-Smads de la voie d'activation des TGF- β s et de l'Activine sont Smad 2 et Smad 3, Smad 1, 5 et 8 étant recrutés dans la voie d'activation des BMPs.

- les Co-Smads (*Co-mediator Smad*) sont recrutés dans le cytoplasme par les R-Smads phosphorylés, et les complexes R-Smad/Co-Smad sont transloqués dans le noyau où ils interagissent avec des co-facteurs nucléaires pour se lier à l'ADN (Figure 22) au niveau de séquences spécifiques, afin d'activer ou de réprimer l'expression de gènes spécifiques. Deux Co-Smad sont connus : Smad 4 chez l'homme et la souris, et Smad 4 β chez le Xénope

- les I-Smads (*Inhibitory Smads*) agissent comme des antagonistes des autres Smads. Smad 7, inhibe la phosphorylation des R-Smads en occupant les récepteurs de type I, préférentiellement dans la voie de signalisation des TGF- β s et de l'Activine. Smad 6, inhibe au contraire la voie des BMPs, en entrant en compétition avec Smad 4 pour la liaison avec Smad 1, et bloque ainsi la cascade d'activation. Leur expression est augmentée en réponse à une activation par les ligands, suggérant ainsi la présence d'une boucle de rétrocontrôle négative (Ishisaki *et al.*, 1999).

La transduction du signal des Smads est sous contrôle de nombreux régulateurs autres que les I-Smads (Figure 22). SARA (*Smad Anchor for Receptor Activation*), qui se lie spécifiquement avec les Smads 2 et 3, est une protéine qui maintient les R-Smads dans le

cytoplasme en masquant leur signal d'exportation nucléaire (Xu *et al.*, 2000), et qui facilite l'accès des R-Smad au récepteur de type I activé. Smurf-1 (*Smad Ubiquitination Regulatory Factor-1*) est une ligase qui induit l'ubiquitination des Smads 1 et 5 réduisant ainsi leur accumulation dans le cytoplasme. Leur accumulation dans le noyau est aussi régulée par la MAP kinase Erk (*Extra-cellular Regulated Kinase*). Enfin, TGIF (*TG3-interacting factor*) qui est un co-répresseur transcriptionnel, entre en compétition avec le co-activateur p300/CBP pour se lier au complexe des Smads et inhiber la transcription.

IV.2.4. La myostatine et l'hypertrophie musculaire.

De nombreux facteurs sont impliqués, directement ou indirectement, dans l'hypertrophie musculaire. Cependant la myostatine a été décrite par de nombreux auteurs comme ayant un rôle crucial dans l'apparition de ce phénotype, et ce, dans plusieurs espèces animales. Comme nous l'avons déjà dit, c'est la seule protéine sécrétée qui a été démontrée comme jouant un rôle négatif dans la régulation de la masse musculaire *in vivo*. Sa délétion, partielle ou totale, provoque une augmentation considérable de la masse musculaire. Plusieurs mutations ont été détectées dans différentes espèces.

IV.2.4.1. Expression de la myostatine dans des modèles transgéniques.

Les souris dont le gène codant la myostatine a été invalidé, montrent une croissance considérable de l'ensemble des muscles squelettiques, associée majoritairement, à une augmentation du nombre (hyperplasie) des fibres musculaires (McPherron *et al.*, 1997). Les souris mutantes sont parfaitement viables, et possèdent des muscles deux à trois fois plus gros que ce des souris de phénotype sauvage, ce qui se traduit au niveau tissulaire, par une augmentation du nombre et de la taille des fibres. Les conséquences sur le processus d'hyperplasie semblent cependant moins marquées. Cette augmentation de la masse musculaire est également observée dans deux autres modèles de souris transgéniques. Des souris transgéniques exprimant une forme dominante négative de la myostatine, par mutation au niveau de son site de clivage protéolytique, présentent une augmentation généralisée de la taille des muscles squelettiques due à une hypertrophie des fibres, sans hyperplasie (Zhu *et al.*, 2000). Tandis que d'autres souris sur-exprimant la séquence rencontrée dans la race bovine BBB, marquée par une délétion de 11 nucléotides au niveau de l'exon 3, manifestent une hyperplasie des fibres musculaires sans hypertrophie, comme chez les bovins «hypermusclés» (Nishi *et al.*, 2002).

Espèces	Mutations dans le gène <i>myostatine</i>	Phénotypes des fibres musculaires
Bovin	nt821(del11) nt419(del7-ins10) C313Y Q204X E226X F84L (Grobet <i>et al.</i> , 1997; Kambadur <i>et al.</i> , 1997)	Hyperplasie
Souris	Knockout (McPherron <i>et al.</i> , 1997)	Hypertrophie + Hyperplasie
	nt821(del11) (Nishi <i>et al.</i> , 2002)	Hyperplasie
	Site protéolytique de clivage RSRR →GLDG (Zhu <i>et al.</i> , 2000)	Hypertrophie
	nt775(del12) (<i>Cmpt</i>) (Szabo <i>et al.</i> , 1998)	Hypertrophie
Homme	G → A Nucléotide 5 de l'intron 1 (Schuelke <i>et al.</i> , 2004)	Augmentation de la masse musculaire

Tableau 7: Tableau récapitulatif des mutations connues dans la séquence du gène codant la myostatine, responsables d'une augmentation de la masse musculaire chez le bovin, la souris et l'homme.

Les différences phénotypiques observées dans ces trois modèles peuvent s'expliquer de deux façons. Soit deux voies de signalisation distinctes régulent le nombre et la taille des cellules musculaires *via* la myostatine, soit, et de manière plus probable, les promoteurs utilisés pour diriger l'expression des différents transgènes influencent les phénotypes observés. En effet, Zhu *et al.*, (2000), ont utilisé un promoteur Créatine Kinase, qui est activé tardivement pendant le développement musculaire. Celui-ci interviendrait après l'activation du gène endogène codant la myostatine, ce qui permettrait au peptide fonctionnel d'agir durant ce laps de temps sur la prolifération des cellules musculaires. Cette hypothèse expliquerait l'hypertrophie des fibres musculaires observée chez les souris exprimant la forme dominante négative de la myostatine. Nishi *et al.*, (2002) ont quant à eux utilisé un promoteur ubiquitaire, la β -actine, qui est activé précocement, permettant ainsi au transgène d'être exprimé très tôt. Cette absence de régulation au niveau de la prolifération des myoblastes expliquerait l'hyperplasie observée chez ces souris transgéniques. Par ailleurs, les souris dont le gène codant la myostatine a été invalidé présentent le même phénotype.

IV.2.4.2. Mutations spontanées dans le gène codant la myostatine.

Un phénotype « hypermusclé », lié à une mutation dans le gène codant la myostatine, a été mis en évidence chez la souris « Compacte » (Szabo *et al.*, 1998). Cette mutation est une délétion de 12 pb dans la séquence codant le propeptide (Tableau 7), localisée dans la protéine, juste devant le site de clivage protéolytique. Ces lignées murines ont été obtenues au terme d'un long programme de sélection.

Chez l'homme, six mutations silencieuses ont été mises en évidence (Ferrell *et al.*, 1999). Deux mutations sont situées dans l'exon 1 et quatre dans l'exon 2 (Tableau 7). Récemment, une transition d'un nucléotide [G→A] dans l'intron 1 a été détectée chez un enfant présentant une forte musculature dès la naissance (Schuelke *et al.*, 2004). Cette mutation provoque un défaut de l'épissage de l'ARNm de la myostatine qui est plus long et qui fait apparaître un codon stop prématuré lors de la traduction. La mère de cet enfant qui est homozygote pour la mutation, est une athlète professionnelle.

Enfin, le phénotype « hypermusclé », observé dans plusieurs races bovines, est associé à deux types de mutations (Grobet *et al.*, 1997; McPherron and Lee, 1997): une mutation faux-sens, qui conduit chez la race Piémontaise à la substitution d'un résidu cystéine par un résidu tyrosine (C313Y) dans la partie active de la protéine, ou une délétion, de 11 nucléotides comme chez la BBB, qui provoque un changement de cadre de lecture. L'augmentation de la

masse musculaire de ces animaux est toujours associée à une hyperplasie des fibres musculaires, uniquement (Tableau 7). Chez ces mutants, quelque soit la mutation, elle se manifeste toujours d'une manière dominante négative. Onze polymorphismes de séquence du gène codant la myostatine sont identifiés chez le bovin, et cinq, majeurs, sont des mutations « perte-de-fonction » qui sont associées au phénotype de fort développement musculaire. Cependant, la plupart sont caractéristiques d'une race donnée et n'ont aucun effet dans une autre, comme la mutation nt821(del11) qui est caractéristique des animaux de la race BBB mais qui n'entraîne pas d'hypertrophie chez les animaux homozygotes de la race anglaise South Devon (Smith, J. A. *et al.*, 2000). Plus récemment, deux polymorphismes supplémentaires ont été identifiés dans la région promotrice du gène codant la myostatine, dans plusieurs races européennes (Crisa *et al.*, 2003). Aucune association directe n'a pu être établie avec le phénotype, excepté pour la race italienne Marchigiana, seulement si les individus sont également porteurs d'une mutation dans la région codante. La transversion T/A détectée en position -371 par rapport à l'ATG, avait pourtant déjà été mise en évidence chez le porc (Stratil and Kopečný, 1999) et associée à une augmentation de la musculature (Jiang *et al.*, 2002).

Néanmoins, l'hypertrophie observée dans certaines races, comme la Limousine et la Maine Anjou, n'est associée à aucune mutation fonctionnelle (Grobet *et al.*, 1997) et à aucun polymorphisme susceptible de modifier la régulation transcriptionnelle du gène codant la myostatine (Crisa *et al.*, 2003). L'acquisition de ce phénotype pourrait être du, dans ce cas, à d'autres mutations non encore détectées dans le promoteur ou dans les séquences introniques, ou du à d'autres mutations situées dans des régions chromosomiques ségrégeant avec les allèles de la myostatine qui influencent le fort développement musculaire. Il pourrait également être du à d'autres gènes, éloignés du locus *mh*, mais prépondérant pour l'activité fonctionnelle de la myostatine. Ainsi, les différents acteurs de sa voie de signalisation, pourraient être responsables, lorsqu'ils présentent des modifications, d'un dysfonctionnement de la régulation négative de la myostatine exercée sur la croissance musculaire, puisqu'ils ne pourraient permettre la transmission correcte du signal inhibiteur dans les cellules musculaires.

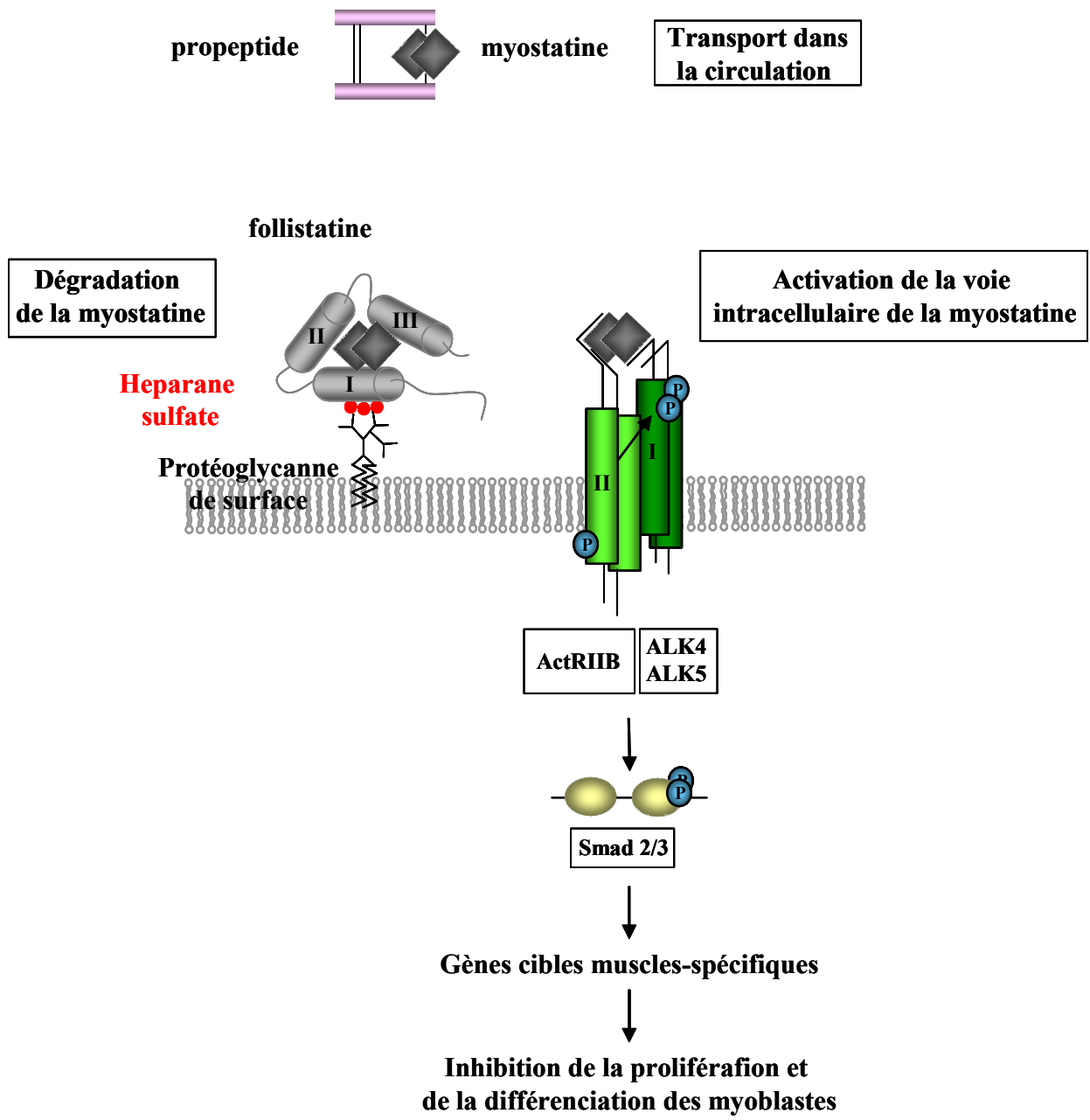


Figure 23: Modèle de signalisation de la myostatine.

La myostatine se complexe avec le propeptide qui l'inactive pendant son transport. A la surface des cellules cibles, la follistatine peut interagir avec des protéoglycannes de surface *via* un domaine héparane-sulfate. Ainsi elle régule la fixation de la myostatine sur son récepteur ActRIIB, soit en la libérant, soit en la dirigeant vers des complexes de dégradation intracellulaires.

Dans le cadre de cette thèse, deux gènes candidats codant deux protéines agissant en amont de la cascade de signalisation de la myostatine ont été étudiés (Figure 23), afin d'établir une éventuelle association entre des polymorphismes de séquence et la forte musculature observée chez les animaux ne présentant aucune mutation connue dans le gène codant la myostatine. Ces deux protéines jugées majeures, sont le récepteur de la myostatine, ActRIIB, et une protéine régulatrice de sa fixation sur son récepteur, la follistatine. Elles ont tout d'abord été identifiées par Lee et McPherron (2001) comme ayant une forte affinité pour la myostatine au cours de différentes expériences de liaison, réalisées avec plusieurs membres de la superfamille des TGF- β s. De plus, des expériences d'inactivation des gènes codant ces deux protéines chez la souris, ont permis d'obtenir les mêmes résultats phénotypiques que ceux obtenus avec des souris délétées pour le gène codant la myostatine. En effet, des souris ActRIIB $-/-$ ou sur-exprimant la follistatine (Lee and McPherron, 2001), présentent une forte augmentation de leur masse musculaire squelettique, tandis que des souris follistatine $-/-$, présentent une masse musculaire réduite à la naissance (Matzuk *et al.*, 1995). Ces observations phénotypiques reflètent une sous-activité et une suractivité de la myostatine, respectivement.

Le récepteur est la molécule qui transmet spécifiquement le message du ligand à l'intérieur de la cellule afin que des gènes cibles, également spécifiques, soient activés. Nous avons vu précédemment que les ligands de la superfamille des TGF- β s se partagent de nombreux récepteurs, et aussi que les mêmes interactions ligands/récepteurs dans des types cellulaires différents, donnent naissance à des réponses spécifiques distinctes. De nombreux facteurs sont impliqués dans la spécificité de ces messages, cependant, les récepteurs qui activent la cascade de signalisation en amont, sont les premiers impliqués. Dans cette famille de récepteurs à Ser/Thr kinases, Shi et Massagué (2003) ont montré que le récepteur de type II joue un rôle important dans la détermination de la spécificité de la formation du complexe de récepteurs. Par conséquent, ils sont essentiels pour l'activation spécifique des différents facteurs intracellulaires transducteurs du signal, et pour la spécificité de la réponse biologique. De plus, il a déjà été montré que la surexpression d'une forme tronquée d'ActRIIB, pouvait bloquer la signalisation de différents ligands TGF- β s, comme l'activine A (Pierson and Matzuk, 2001).

La follistatine, est une protéine inhibitrice, qui régule l'activité de nombreux facteurs TGF- β s, très tôt dans l'embryogenèse, pour induire une spécificité cellulaire (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997). Elle est également exprimée très tôt dans le tissu musculaire squelettique, dans des régions très proches de celles où est exprimée la myostatine (Amthor *et*

al., 2004), afin de réguler l'effet inhibiteur de cette protéine sur la croissance des cellules musculaires. La follistatine agirait localement pour antagoniser la myostatine. En effet, grâce à son domaine héparane-sulfate, la follistatine complexée à la myostatine, peut interagir avec des protéoglycannes situés à la surface des membranes cellulaires. De cette façon, elle pourrait réguler la concentration des ligands à proximité du récepteur, leur libération afin qu'ils puissent se fixer leurs récepteurs spécifiques, ou leur dégradation en les dirigeant vers des cellules spécialisées.

Ces différentes observations illustrent la participation importante de ces deux protéines au processus de régulation de la masse musculaire. L'étude approfondie des gènes codant ces deux protéines nous a donc semblé incontournable dans le cadre d'une thématique de recherche sur la compréhension des mécanismes moléculaires responsables du fort développement musculaire des bovins.

Résultats

L'étude et la compréhension des mécanismes moléculaires responsables du fort développement musculaire des bovins, dans le cas des individus non porteurs de mutations connues dans le gène codant la myostatine, nous a conduit, dans un premier temps, à essayer d'identifier le, ou les récepteurs de cette protéine, inconnus au début de ma thèse. L'hypothèse était que des variations de la séquence, du niveau d'expression ou de l'affinité du récepteur, pouvaient être associées à l'apparition d'un phénotype similaire. La myostatine étant une cytokine de la superfamille des TGF- β s, il nous a donc semblé judicieux d'orienter nos recherches, vers la détermination d'un récepteur, qui posséderait des analogies de séquences avec les autres membres de la famille des récepteurs des TGF- β s.

Cette famille est constituée de deux sous unités de récepteurs. Des oligonucléotides dégénérés ont été dessinés à partir de séquences consensus résultant de l'alignement des séquences nucléotidiques des gènes codant des récepteurs de type I (ARI, ALK1, BMPRI et T β RI) du poulet, du rat, de la souris, de l'humain et du bovin, présentes dans les banques de données. D'autres oligonucléotides dégénérés ont été dessinés à partir des régions très conservées entre les séquences des gènes codant les récepteurs de type II (ARII, ARIIB et T β RII) des espèces murine, humaine, ovine, bovine, et des séquences du rat et du xénope, présentes dans GenBank. Ces oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier les éventuels ADNc correspondants aux mêmes gènes. Cette stratégie de PCR hétérologue n'a donné aucun résultat concluant, puisque les diverses séquences obtenues n'ont jamais révélé de similarité de séquence avec aucun récepteur connu.

Dans le même temps, Lee & McPherron (2001), ont publié des résultats qui caractérisaient le, ou un des récepteurs de la myostatine, ActRIIB, appartenant à la famille des récepteurs des TGF- β s, et caractérisé principalement pour son rôle dans la voie de signalisation de l'activine A. Ces auteurs mettaient également en évidence, l'interaction biochimique d'une autre protéine avec la myostatine, la follistatine, une protéine de liaison, régulatrice de l'activité de nombreux ligands dont l'activine A.

Ces nouvelles données ont permis de préciser notre axe de recherche, nous avons donc décidé d'étudier les séquences bovines des gènes codant pour ActRIIB et la follistatine.

Les résultats de travail sont présentés en quatre parties :

- la structure génomique des gènes *ACVR2B* et *FST* bovins
- une étude d'expression des gènes *ACVR2B* et *FST* dans divers tissus bovins
- l'identification de polymorphismes dans la séquence des gènes *ACVR2B* et *FST* bovins
- une étude d'expression *in vitro* du promoteur du gène *ACVR2B*.

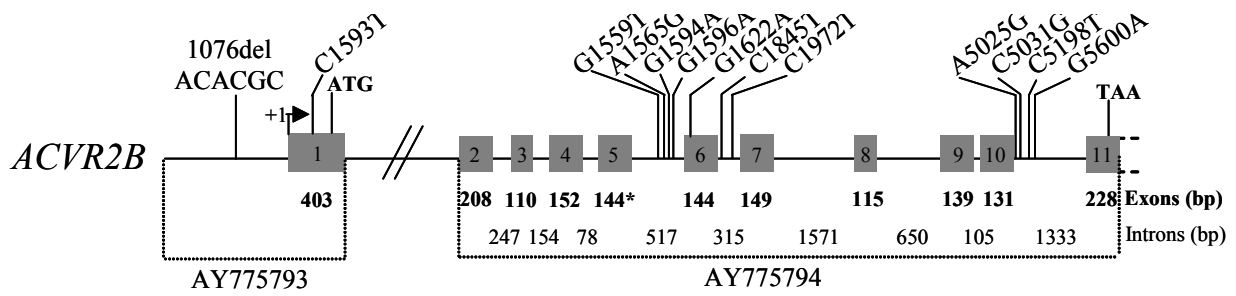


Figure 24: Structure génomique et polymorphismes du gène *ACVR2B* bovin.

Représentation schématique de l'organisation génomique du gène *ACVR2B* et positions des polymorphismes identifiés (les positions sont données à partir des séquences de référence AY775793 et AY775794).

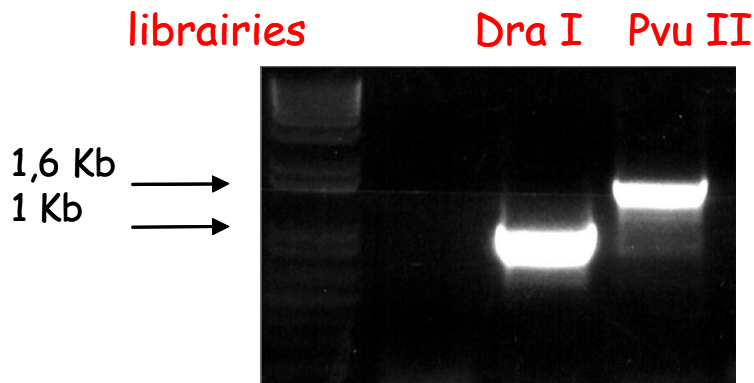


Figure 25: Amplifications obtenues par la technique GenomeWalker™ (voir Matériels & Méthodes).

Les fragments d'ADNg bovin générés par les enzymes de restriction *Dra*I et *Pvu*II, ont permis d'amplifier deux fragments correspondant à la partie 5' du gène *ACVR2B*. Le fragment de 1,6 Kb, contenant plus d'informations de séquence, a été élué puis séquencé.

*I. Structures génomiques des gènes *ACVR2B* et *FST* bovins.*

Les séquences nucléotidiques des gènes *ACVR2B* et *FST* bovins n'étaient pas connues lorsque ces travaux ont débuté, seules les séquences des ADN complémentaires étaient accessibles dans GenBank aux numéros d'accès NM_174495 et NM_175801 pour *ACVR2B* et *FST* respectivement. A partir des séquences d'ADNc, nous avons dessiné des oligonucléotides afin de déterminer les séquences introniques des deux gènes, les jonctions exons/introns putatives ayant été provisoirement déterminées après alignement avec la séquence génomique humaine.

Les régions situées en amont de l'ATG ont été obtenues à partir d'ADN génomique bovin par la technique de GenomeWalker™ (voir Matériels & Méthodes).

Le site putatif de démarrage de la transcription (+1), a été obtenu grâce à des amplifications successives réalisées par PCR à partir d'ADNc bovin, à l'aide de différents couples d'oligonucléotides, dont les amorces sens étaient dessinées à partir de la séquence obtenue en amont 5' par la technique GenomeWalker™, et les amorces antisens à partir des séquences exoniques connues.

*I.1. Le gène *ACVR2B* bovin.*

Deux séquences nucléotidiques ont été obtenues pour le gène *ACVR2B* (Figure 24). La première, de 6490 pb, s'étend de l'exon 2 à la région 3'UTR (annexe 1 ci-après). La seconde, obtenue par la technique GenomeWalker™ (Figure 25), a une taille de 1709 pb (annexe 1). La grande taille supposée de l'intron 1 n'a pas permis son amplification. Les amorces sens des différents couples d'oligonucléotides qui ont permis la détermination du +1 putatif, sont représentées sur la Figure 26, par trois flèches noires, numérotées 1, 2 et 3. L'amplification obtenue avec l'amorce 3, nous a permis de déterminer 351 pb de région 5'UTR et 1306 pb de région promotrice. Sur cette figure sont également représentés différents sites de reconnaissance des facteurs de transcription, et un grand îlot CpG, caractéristiques d'une séquence promotrice.

Annexe 1

Les séquences nucléotidiques du gène *ACVR2B* bovin sont présentées ci-dessous. Les séquences des exons sont en lettres capitales. Les séquences des introns sont en lettres normales. Les différents polymorphismes détectés dans les individus de race Bazadaise génotypés sont en lettres rouges. Les sites de démarrage (ATG) et de terminaison (TAA) de la traduction sont surlignés en gris

Région 5' jusqu'à l'exon 1 (AY775793) :

```

1 CAACGGCCCCG GGCTGGTAAG GAATGTAGAG CATGGAAGGA ATCTAGCCTA
51 CTCACATTTT CCCCTTTATT TATTTAGCCT CCTCGCTTTC TGTA AAAAGGA
101 AACTGAGGCT CAGAGAAGTG AAACA ACTCA GACTTCCAGG CTCCACCTCG
151 AGCCTGACTC CTCCTGTCCT GCTCCAAGAA AGGTTGTGGC AAATCAGGAG
201 CCAGACGACC ATTTCTGTAC CGAAGGATTC TGCCCCTCAT CCCTGAGATG
251 TGAGCTGGCT TTCCCTCTTT AGCTGGGAGC CTCATCTGCT GCTGCTGCTA
301 AGGCGCTTCA GTCGTGTCCT ACTCTTTGCA ATCCTATGGA CAGCAGCCCA
351 CCAGGCTCCT CCGTCCATGG GAGTCTCTAG GCAAGAATAC TGGAGTGGGT
401 TGCCATTTCC TTCTCCATCA TGACCCTCCC AAGCCCTGAT TGTGGTAAGG
451 ATGGTAGAAA CCGACACAGA AAACAAGGAG CTCTCAAGAA GCCATTTGGG
501 GAGTGAAGAG GGTAGCAGAG AACTCGCTG GACAAGCTCC ACTACGGGAA
551 GAACTGAGAA CAGTTTTGAA TGCGCAGATT AAAGCGGGAG TGGGGTGGGG
601 TTAAGGGTAG AGAGGCAAGT CGCTGGAGGC CCTATTCCAT CTGCTGCTGC
651 TCTGCGGGGG CGGGGCTCCC ACTCTCCCTC CCTGGGATGT GTCCAATTTTC
701 AAGATCCCCA GCTGTGCCTT TGTGTGTGTT TGGGGTTGGG TTACGACGTA
751 AGAGACCACT TGTCATTTTA GGGAAATCAG CCTTTTTTTTC CCCTGCAGAT
801 TAGTTCGCCT ATCAATTCAG ACACGACTCC TGTGGTTTAC TGTGCCCTCC
851 ATCTCAGGTA GGGAGACGGA GGCGCAGAGG GGAATCCAGG CCCGAGACCC
901 CGGGCGACCC AGCCTCTCCG TGGTCGCAA GCAGCATGCG TTCGGGAGCT
951 TGGGCTCGAG TGCAAAGCAG GAATCACAGT GCCGTGGCCA CGAGGTCCC
1001 GGGTCTGAG GCTAAGTGGT CCAGGACCCA ATCCTGCCAG CTCACCTGTC
1051 CTCGCCCTCG GGTGCTGCAT TTTGCAACACG CCTTCCAGAC CAACCCGGTC
1101 GGGGGGCGGG GCCTTCGTTT GTTGTTTATC TGCGGCCCCG CCCCCGAGGG
1151 GGGCGCGGAC CACGCGGCCG GAGGGCCCGC CTCCCCTCCC CCTCCCCTCC
1201 CAGCTCGCCC GCCTCTTTGT ATCCAACATC CGGGTTTCCC CGCTGGCTCG
1251 GCTCCGCGGC CGCGGCTCAG GAGCCATTTT GGA CTGGTT CAGCTCCCC
1301 TCCCCCCCGT TCATGGCCCC TCCGGACTCG GCCCCTGTGC CCGGGGCCCCG
1351 GGCCCAGCCC CGCCGCGCGA TGCCTGAGTC GGGCGCGCCC CGGCCGCGC
1401 CCCGCCGCCG CCCCCGGCC CCGCGTCGTT CTCAGAGCCC GGGCCGAAGC
1451 CTGCAGCGGC CCTGAGCCCG GCCCCGCGT CCGGCCCTTG GAGCCTGCAC
1501 GCTGCCGGGG ACGAAGGCGC AGGAAACGCG CGGGGAACGA GGCCGAAGGA
1551 AGGAGCGGGA AGGAAAGCGC AGCCGCGCC GGGCCCTGCG CGCCCCGGGA
1601 GCGCCGCGCG GTCCTGTCCC GCGGGCTCCG GGTGTCCGCG GGGCGGCGCC
1651 GCGGAACATG ACGGCGCCCT GGGCGGCCCT CGCCCTCCTT TGGGGATCGC
1701 TGTGCGCCG

```

exon 2 à exon 11 (AY775794):

```

1 GTTCGGGGCG CGGGGAGGCC GAGACACGGG AGTGCATCTA CTACAACGCC
51 AACTGGGAGC TGGAGCGCAC CAACCAGAGC GGCTTGGAGC GCTGCGAGGG
101 CGAGCGGGAC AAGCGGCTGC ACTGCTACGC CTCCTGGCGC AACAGCTCGG
151 GCACCATCGA GCTCGTCAAG AAAGGCTGCT GGCTGGACGA CTTCAACTGC
201 TACGACAGGT GCCGGCACCC CCGAGGCCGG GAGTCTGGAG TCCACACGGG
251 CTGTGCGCCG GTCCCAGCCC TCCC GGTTT TGAGGTCCCC AGTGATGCTG

```

301 GAAGGGTTGT CCCC GCCTTG GATCTGCGTC CCGCTTCTGG GGAGCCCGAC
351 CCCACGGTT CCCCATAGGA TCTCTGTCTG TGGGGAGGGC TTTGGCTGGG
401 CCGCCCTGGG AGTCTGTTCC TCAGCCGAGC TGTGGATGGG AAACCTGTCC
451 TCCAGGCAGG **AGTGCCTGGC** **CACCGAGGAG** **AACCCCCAGG** **TGTACTTCTG**
501 **CTGCTGCGAA** **GGCAACTTCT** **GCAACGAGCG** **CTTCACCCAC** **CTGCCCGAGG**
551 **CGGGCGGCC** **AGAAGGTGAG** GCGTGGGGG GAGCAGATGT GGGCCGGCTT
601 TGGCCCCCAG ATGCTCGGCT TCTGCGTGGG GTGGGGAGCG GCTGCAGGGG
651 TCTCTGGTCT GGCTCTGGAG GTGCGCAGGT AGGCGCACTG TGTGACGCTG
701 GGTCCCGTGT GTCCCTAGT **CACGTACGAG** **CCACCCCCGA** **CAGCCCCAC**
751 **CCTGCTCACT** **GTGCTGGCCT** **ACTCGCTGCT** **GCCCCCGGG** **GGCCTCTCCC**
801 **TCATCGCCCT** **GCTGGCCTTC** **TGGATGTACC** **GACATCGCAA** **GCCCCCTAC**
851 **GGCCACGTGG** **ACATCCACGA** GGTGAGACGG GGGTGGCTCG GGGTGGGGCG
901 GGGTAGATCC TATTATGGCC AGATCCTGTT AAGCCCTGGA TCTCCCTAGG
951 **ACCCTGGACC** **TCCACCCCCG** **TCCCTCTGG** **TGGGCCTGAA** **GCCTCTGCAA**
1001 **CTGCTGGAGA** **TCAAGGCTCG** **GGGGCGCTTT** **GGTTGTGTCT** **GGAAGGCGCA**
1051 **GCTCATGAAC** **GACTTCGTGG** **CTGTCAAGAT** **CTTCCACTC** **CAGGTGTGTG**
1101 TCTGCCTGTG GTGGGGGGAG TCTCCAGGTC ATCTGGCTGG GCCTGAGCC
1151 CTCCTGCCCA AGAGCAGTCC ATACCCTGTG TAAGCGGGGT GAGAGAGGAA
1201 TGGGCCCCAT TGCGGGTGGC GGGCCTAGGG TAGAGCTTTG TGAAACCTTG
1251 ATTTGCAGAA CTTCAGTCCA CCCTGGTTTT CAGGGTTTTG CTTTGACATC
1301 AGGTTCTGCT TAGAGGCCCT GGACACAGGC TAACGGAGCC ATTGCCCAAG
1351 ACACTTGGCA GAACCAGGCC TGCTCTGCTT CTCGTTGGTT GGGTGGTCTT
1401 GGGCCACTCA TTTCTGTAC TCTGGACCTC AGTGCCCCCT GTCGTAATC
1451 AGGTGCTGGC CTTAGTGATC TCAGGGCTCA CCGCTGGCCT GTGGTCTTG
1501 GCCCCGCTCA GTCCTGCCCT GCGCCCTGAC AGGCTTGGAG GTTGGGAGCG
1551 GGTGGGAGC TGCCAGGCGG CATGGCTGCG GTGGGGTTCA GCCCGCTTC
1601 CCTGCTTCAG **GACAAGCAGT** **CGTGGCAGAG** **TGAGCGGGAG** **ATCTTCACBA**
1651 **CGCCTGGCAT** **GAAGCACGAG** **AACCTGCTGC** **AGTTCATTGC** **CGCTGAGAAG**
1701 **CGAGGCTCCA** **GCCTGGAGGC** **AGAGCTGTGG** **CTCATCACGG** **CCTTCCACGA**
1751 **CAAGGTGAGC** CTTGCCCTGC GGACCCTGCT CCCGCGGGAG GTGACCATGG
1801 GCCCACCGTG GCCTTCCCCG AGGTCCCCTG CACGGGTGTG GACACGAGGG
1851 TCTGCAGGAA GAACCCCTCT CCCTGGGATC AGTTCCTTGA AACAGGAGTA
1901 GTGACTTCAT GATTATCACT GTCTGACATC ACCCGCTTCC CAGCCCTCC
1951 TGGCCTCGTC GGTGCCAACC **TCTGCTGGG** GAGCTCAGCC ATCTGACCCA
2001 CGGGTACTGC CCTCCAGGGG CAGGGCTGGG TCCTGCCCCG GTGCCAGAG
2051 CCTGTGCTGT CTCCCGTAGG **GCTCCCTCAC** **GGATTACCTC** **AAGGGGAACA**
2101 **TCATCACATG** **GAACGAACTG** **TGTACAGTGG** **CAGAGACGAT** **GTCTAGAGGC**
2151 **CTCTCATACC** **TACACGAGGA** **TGTGCCCTGG** **TGCCGGGGCG** **AGGGCCACAA**
2201 **GCCATCTATT** **GCCCACAGGT** ACCTGGGTTA GCAGTTGCC TCTCTTCTCT
2251 TGACCTGGAG CCACAGAGAG GGTTAGAGGT TGAGGGCAGG GCCCGGTGGG
2301 GGTGGTTCTC AGTTTCATAA ACATGCTTAG CCGCTCTGTG GTGTGTCAGG
2351 GGCAACCCTG GCCCTTCCCC TGACTTCCAC CCTTGTCTGC TCAGGCTGTG
2401 GTCTTGAAG CTGGTTCTCT GGTGCCCTCC AGTGGCCACA GAAGGAAGTG
2451 CTGATTCTGT CCCTGGTTGG AGTTCGTGTC GTTGATCCTT GCTGTATTAG
2501 AGCATAcata TCCTGTTAAC TGTCAGAGTG ACGACGTGTG TATACGTGTG
2551 TATGTAGCCT CTGGAAAAC CTGTAGTCCT GGGAGAATGA GCTTTAAGAA
2601 AGGCAAATAA CGGATTATTA TGAAAGGAAT GTTGACCTTG CAGATCCCCCT
2651 GAAACAGTCT CGGGGATTCT CTGGAGTCCT TGGATGGTGC TTTGAGAGCC
2701 AGTCTGTTTG TTACCTTATC ACAGTGGCAG GCACTACTCT AGACACTCCG
2751 AAATGCCAAG TCCTTTAAGC CTCCTAACTG CTCTGTGACA TAAGCACTAT
2801 TTTCCCCAGC CCTTCTTACA GGTGAAGGAA CAGCAGACA GAAAAGATGA
2851 CCTAGTTTAG TGTGGCAGGG AGGCTCCTCT CTGACTGTGA GGGGGCTCA
2901 GATTCTGGGG TTCAAAGCTG CAGGGCCACA GTGGGCATAA CATGAATGAC
2951 ATAGGGCATT GACTGTAGAA ATTACCGTTT CTGTAGGTCA AACACGGTTG
3001 AATGCTGACT CTTCAATTGGG TCCAGGCTAA CAATAGTGCA TAGTAAGTGT
3051 GCCGGGGTGG CTCGTCCGTC AGTTTAGTCC TCAGAGTAAG GCTGAGACAG
3101 GCATGAGGAA GTTGAGGACC TGCTAGGGAA AGGCAGGGCT GAGCGCAACC
3151 CCAGCGCCCA CTGCACCACC TCCAGAGCAG CCCGAACCTC TGGGGCAGCA
3201 GTCCCCAACC TTTTGGCAGC AGGGACCAGT TTTGTGGAAG ACAGTTTTTC
3251 TACGGACTGG GGTGAGGGTG GTTTCAGGTT GATTTAAACA TGTTACATTT
3301 CAGTGCACCT TATTTTTATT ATTACTGTAT TAGCTCTACC TCAGATCATC

3351 AGGCATTAGA TCGTGGAGGT TGGGGACCTC TGCTCTGGGG CCTGCTCAGA
3401 ATCAGGCAAA TTCATTGAAA CTTCTCTTTT CACTTACATC CCAAACGGTG
3451 TAAATTCTTG CCAGGAAACT TACATCCCCA GCTGCAGTGC CCCTCCTCAA
3501 ACCCTCTGAG AATGTGAGGG CTGGCCTTTG ATGCTGGGGA CTAGACGGGG
3551 GTTGGCGTTG CTGTGACAGC TCTGGTCGGA GTGCAGTTAG GGATTCTCAC
3601 ACTGACGGAG GGGAGTGTCC TAAAGCTGCC TGCCTGTGTG GCTTCGTGGA
3651 ACTCCAACCT GGTGCAGACC CTGCTCCCCA CAGGGTGGGA TGGGCCCCGG
3701 CTTAGGGCTC TGGGAGTCCA GGTGGGAAGG CAGGAGCAAG GTCGATCGGA
3751 CCACAGGTTT GGCTCCCTCT CAGTCCACTG TCTCCACAGG **GACTTTAAGA**
3801 **GCAAGAATGT ATTGCTGAAG AGTGACCTCA CTGCTGTGCT GGCTGACTTT**
3851 **GGCCTGGCTG TTCGGTTTTGA GCCAGGGAAA CCTCCGGGGG ACACTCACGG**
3901 **GCAGGTGACG AGCCTCAGGG GATAGAAGAC AGGGGTGGAC ATTGCCCTTC**
3951 TGGTGTGAGC TGGCAGGGGA CAGGGGTCAC CCCGTGAGCT CAGAGTTGTC
4001 TGAGAACCCT AGGGGCTATG CTCTCATTTT ACCAGTGGGG AGGTGAGGCC
4051 TGGAGGGTGG CATGGCTTCC TGCGCCGGTC AGCGAGAAAC AGATTTCCT
4101 TCCCTCTTTC AGTAATTATT AAACAAGATA AAAATAAGAT AAATAAATAA
4151 GTGTATATTA AGAATCCAAA TCAAAAACCT GGAGAAAAAG TAACCTAAAG
4201 TTAAACCTGA GCAGATCATC CTAAAACAAC TGCTGTTAAT ATTTTGAAC
4251 ATTCTCCCC TTCTGTTTTT GGTGGCAGTC TCAGTAAAAT ACACATTATC
4301 TGTGGAGCCC CTTGTGGTGT TGATGGAGTA AAGAGGCAGC GGTTCTGTGG
4351 TAGACTACTA CTGTCTGGAG TCATATTCAC AGTCGTCATT GCATCGTGCC
4401 CTTGTAGGC TCCCCGCCCC CTCCTCCCCA CGACCATCGG GGACAGCTGT
4451 CATTGTGATG GACCCTGCTG TGCACACGGG CTGTAGCTCC CATGTCCTGT
4501 GAGTGCATCT CTACATGCTT GGTGACCACA GCCCCTCCCC TAGTCCTCAC
4551 GACGTGGGC **ACGGGGCGGT ACATGGCCCC CGAGGTGCTC GAGGGAGCCA**
4601 **TCAACTTCCA GAGAGCGCC TTTCTGCGCA TCGACATGTA CGCCATGGGG**
4651 **CTGGTGTGCT GTGAGCTCGT GTCCCCGCTG AAAGCTGCCG ATGGTGAGCA**
4701 GGGCAGGAGC CCCGAGCGTC CTGGGTGTGG TGGGGGAGAA GTGGGGCAGT
4751 CGGGTGACCC CCTCCCAACC CCGCCTCGGG ACTCACTCTC TCCTCCAGGA
4801 **CCTGTGGATG AGTACATGCT GCCTTTTTGAG GAGGAGATCG GCCAGCACCC**
4851 **GTCACTGGAG GAGCTGCAGG AGGTGGTGGT GCACAAGAAG ATGCGGCCCG**
4901 **CCATCAAGGA TCACTGGCTG AAACACCCGG TGAGGGCCGG TGGGGGGCGC**
4951 TGCGGAGGAG GCTGTGGGCA CAGGATGCTG ACGCCAGGAG GGGAGCTTCA
5001 CCCAGCGTCC TGTGTGGCAG GGCCAGAGGG **CAGGGCTCAG** GCCGCAGGAC
5051 CGGCCCCCCC TCACGCCGGG GCAGTGCCTC CCTTCCACCT GGGGAGTGTC
5101 TGTGCGGGTT AGTGCTCTCC AACTGGGGCG GCGGCTCTGG TTTTGACCCC
5151 AGAGAGTGAT GGGACCTGAC ACATGGGATG GAAATCCTGG ATCTGTCC**CGT**
5201 CAGTAGCTGG GTGACATCAG GCAAATTGCT TTAATTCTCT GAGCTCTTGT
5251 CTCCTCAGGG TAGTATTAGA TTTAAGGAGT TGCTGTAATT CACTGGGCAG
5301 GACACCTATC ACTTAAGTGT TTAATATGGC TTAGCTCTGA TGAAGTAATC
5351 GCTTTTCCCT GCCCTCATCA AGTTTTTGGAG CCTGGGCTGA GCTACGTGGC
5401 ATCTGGGCCC CTCCAATCTG GGGACATGTA CAAAAGACCC CAGCTGTGGA
5451 AACCTTTAAC ATTTCTTGGG TATTTGCCTT GAGCTCCATT GAATCCTTTT
5501 CCCCTGGCAC CCTAGGGTTA ATTCAGAAGG ACACCATTGG GGGCTAGCCC
5551 TCTTCCCACA TGGTCAGGGG TTGACCTGTG GAGGTCAGGT TCTGTGCC**G**
5601 TGCTGCTTGC TCTGTGAAAC CCAAGACTGC AAATGGAGAA AATTTAGGCA
5651 CAGGGAGAGG GATGCTGGGC CTTACCTTCT GCCTCAGACC TTCAGTTTCT
5701 CAGGGCAGAG ATGCTGCGGT TGCCAGTCCA GTTCTCTGAT GTGGAACAGG
5751 TCCAGAGGGG TCTGAGTGTG GCCTAGTGCC AAGCAGGCCG GATTGTTCTT
5801 GGGTATGGAT GGGCACTTTG CTCATCTTGC GGCTTTTCCC AGCTACACGC
5851 AGTTGGTTCC AGCACAGGGT GTCAGGCCAC ATTCCCTGGA CTCTGGGGAG
5901 GTTCTGGGGG CCGTGGGGAA AAGGGTGGGA TGAAGTCCCC CTCTGTCTCC
5951 ACTGTAACTG CACATTGGGC CCCTGTGTGA TTTGGGTTTT GCCTGAGATT
6001 TTGTTGCAGT GTCACCACTC CAAGGCAGGC AGCCTCGTGG GGCCCTGGAC
6051 TCCCTTGTTG AGTACTGAGG TTCCGTGGCC CTTTCTTGGG GGCTGTGGAG
6101 GAGGCCGGTG GGCTCAGGAT GCTGACTGCT GGCAGGGGAG CTTGCCCCAG
6151 ACCCCTGTGG ACAGGCCTGT GGGCTCAGTC CTCAGGAACA TCACTGGTTT
6201 GCTTGTCTCT ACTGAGGGCC ACCAGCAAAG GCATGTGTTT CCCCTCTTCC
6251 GCCGGCATGC AGGGCCTGGC **CCAGCTCTGC GTGACCATCG AGGAGTGCTG**
6301 **GGACCAGGAT GCAGAGGCTC GCCTGTCTGC GGGCTGTGTG GAGGAGCGAG**
6351 **TGTCCTGAT CCGGAGGTCG GTCAACGGCA CTACCTCGGA CTGTCTTGT**

6401 TCCCTGGTGA CCTCCGTCAC CAATGTGGAC CTGCCCCCGA AGGAGYCGAG
6451 CATCTAAGCC CAGGACACGA GTGGATCTCC AGACTCAGTA

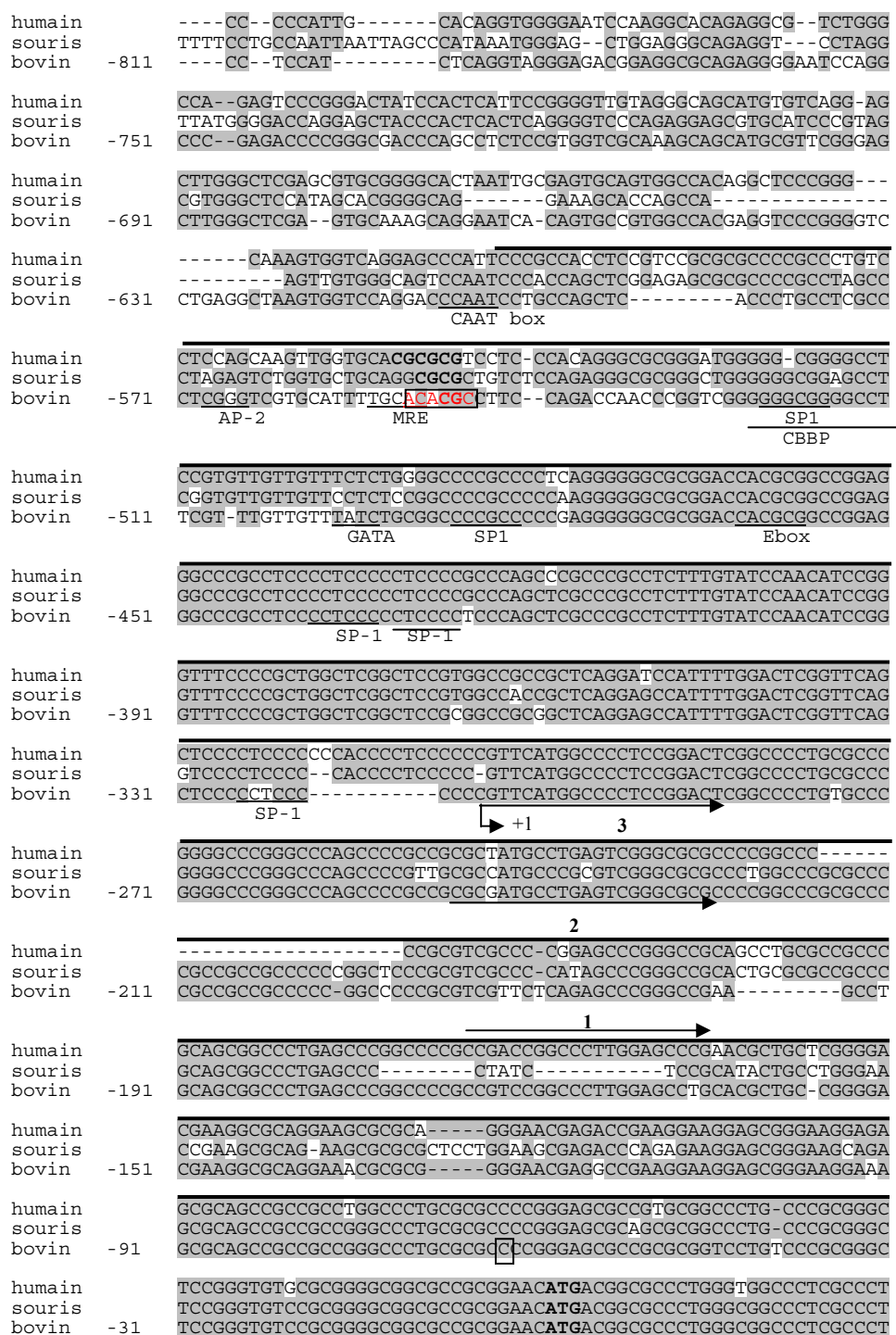


Figure 26: Alignement des séquences humaine, murine et bovine des régions promotrice et 5'UTR du gène *ACVR2B*.

Les bases conservées sont surlignées en gris. L'îlot CpG est indiqué par une ligne noire au dessus de la séquence. Le nucléotide +1 bovin putatif de démarrage de la transcription est indiqué par une flèche, et les trois oligonucléotides ayant permis sa détermination sont indiqués par 3 flèches sur la séquence, 1, 2 et 3. Les sites de liaison des facteurs de transcription sont soulignés et les polymorphismes sont encadrés. Les nucléotides sont numérotés par rapport à l'ATG.

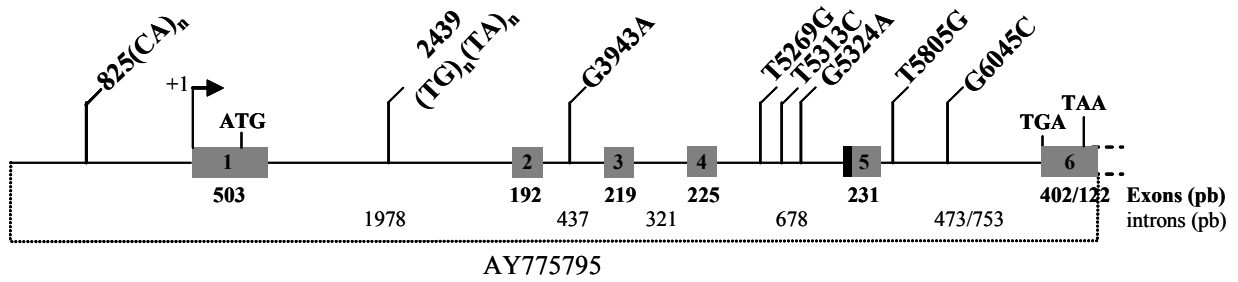


Figure 27: Structure génomique et polymorphismes du gène *FST* bovin.

Représentation schématique de l'organisation génomique du gène *FST* et positions des polymorphismes identifiés (les positions sont données à partir de la séquence de référence AY775795).

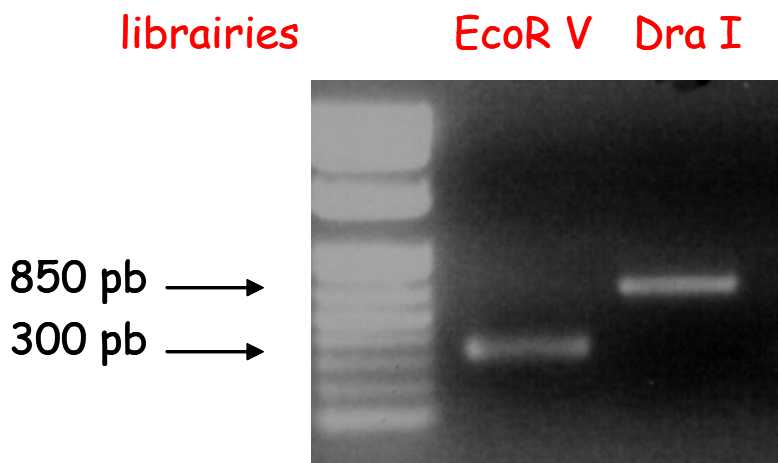


Figure 28 : Amplifications obtenues par la technique GenomeWalker™ (voir Matériels & Méthodes).

Les fragments d'ADNg bovin générés par les enzymes de restriction *DraI* et *EcoRV*, ont permis d'amplifier deux fragments correspondant à la partie 5' du gène *FST*. Le fragment de 850 pb, contenant plus d'informations de séquence, a été élué puis séquencé.

1.2. Le gène *FST* bovin.

Les résultats du séquençage ont permis d'obtenir la totalité de la séquence du gène (6668 pb) (Figure 27 et annexe 2). En 5', la technique de GenomeWalker™ (Figure 28), nous a permis d'obtenir 1030 pb de région promotrice et 397 pb de région 5'UTR, le +1 putatif délimitant cette région en amont, ayant été déterminé grâce à des amplifications successives réalisées sur de l'ADNc bovin. Les amorces sens ayant permis ces amplifications, sont représentées sur la Figure 29, par des flèches noires numérotées de 1 à 4.

L'analyse informatique des séquences de la région promotrice du gène *FST*, et son alignement avec les régions promotrices des espèces humaine, murine et porcine (Figure 29), nous ont permis de localiser les différents sites de liaison des facteurs de transcription qui sont bien conservés entre ces différentes espèces. Les quatre séquences consensus caractéristiques de boîtes TATA, ont été identifiées à partir de la séquence murine (de Groot *et al.*, 2000). Le microsatellite à dinucléotides CA, situé dans le promoteur, et dont nous reparlerons plus tard, est surligné par un trait noir.

Annexe 2

La séquence nucléotidique du gène *FST* bovin est représentée ci-dessous (AY775795).

Les exons sont écrits en lettres capitales et les introns en lettres normales. Les sites de démarrage (ATG) et de terminaison (TAA) de la traduction sont surlignés en gris. Les différents polymorphismes détectés dans les individus de race Bazadaise génotypés sont indiqués en lettres rouges.

```

1  TGGTAAAGGC AGCTTTGGAA TAACAATATA GCATTTTCCG TGCAAGTAAT
51  CGTTTTATAT AAAAGGAAAT ATCGCCTCCT CTGTTTCATT CAGCGGTGCC
101  AAAAATGTTA TAAATGAGAG ACCCGCCAAC TTTCAGCGAA GAATGCCAGG
151  CACTGTGCTT AATAAACTGA GGCTACAGAA GTTCATTATC GATGTTGCAA
201  TCTTTTTTAT TCCGCGAACC GAGAGAGAGA CTGAGAAGGA GACTGAGAGT
251  GAGAGAGACA GACACAGGAC AGAAACTGGG GAGTCTCCGA GCCGCGGAAG
301  GCGGGTAGAC CGCCTACGTC GGCGCCCCCG CTCCGGGCTC CGACTCCTCC
351  AGAAGCTGCG AAGTGAAAGG GGAGAAAAGA AAAGGAGGGC GAGACTGTGA
401  CGGTGGGGGG AGGCCCGGGC CGAGGTGTCA AACATTTTTG TTCGCTTCTA
451  ACTCGTCGAG ACGGAGGGCC GCGTCTCCGC CAGGTTCTGC CCCGGGTGGA
501  AGGTGCCGGG GCCCGGGGTT CCCAGCCACA ACCCTGGGCT CGGGGGTGGC
551  CGCGGCGCTC GGCACGCGCA GACCCAGACA GACAACGTCG TGGGGTCCCG
601  CAGCCAGACT GCGGGGGCCT AACACGGCAG CGACCCGACC TCCGGCGGGG
651  TATTAAGGCA GCTCGGGGCT CTCCGGGCGT TTGCGAAGTC TTCTTGAGC
701  TGAGGAGCGG CGTTGCGAAG ACCAACTCCC GCCCCGCCGC CCCGCTCCGC
751  TCCGCCCTGC CCGCCGCCGC CTCCAGCGCC CTCACCGCGC CAGACATACA
801  CACTCACA CACTCACA CTCTCACACA CACACACACA CACACACACA
851  CACACACACA CACACACGCC ACCCCGGGCG CGCCGGCGCT GCCAGCGAGC
901  GGCGGCGTGC AGGACTTGAA GTGGGTGTTT TTCCCCTCCT CCCACCCCG
951  AAGCGTCCCC CCCACCCCCC CGCGCCCGGG TCTCCTGCCC CCTCCCTCTC
1001 GCTCCTACGC AAATAAGAAC TCGGCGATTG CCTCCTGCC GCTTTGATTT
1051 CGGGCACCTC CACCAGATAA TTGGGAAGGG TTTCAGAAGG TGGGAAGTGT
1101 CACCTGATTC ACACTGAACT TTTAAAAGCT CCCCACCCCC AAGGAACCGC
1151 GCACACCCTC TCTCGCGGCC GCCCTCCAC TGCCCCACAC ACTGGGAGAC
1201 CGCCCACCGC AAACCGTGGA GACCCCGTTC TAGATTTAAA GCGCGGCTGC
1251 GCCTGGCTTC TGACGTCCAT TGAATCGCGA GGGCGGCCGG CGGCAAGTGC
1301 TGGGCTACGC CGGGATAGCT GCGCCCTCCG CCGCTCGCCT CTGCGACCGG
1351 CACCGCTTGC CAGAGCCACC CGCCGCCCGC CCCGCTCCCC GCGCCGCCGC
1401 GCTCCTCACC CCGCCCTGC CCTCAGGATG GCCCGTCTTA GGCACCAGCC
1451 CGGCGGGCTT TGCTCCTGC TGCTGCTTCT CTGCCAGTTC ATGGAGGACC
1501 GCAGGCGCCA GGGTAAGCGA GCGGGGATGC GCAGGGAGGC TCGGCGGAGG
1551 GCAGGGGTTT GTAGTTTTTC GCGGTCTCCA CCGGGTCTGT TCTGAGCAAC
1601 TCTGCTTTTC GAAGATGTTG GACCAACTTA GCGAATCCGG GATGGAGAGG
1651 AGTGGGAGAA TTGAAGGCAG TGACACTTTA GGACTGGGAA CCGAGTTTGG
1701 AGCGCGGTTA TCCTTTAAAA GGAAAGGGAG TGAGCTGGAG TCTCTCTCAG
1751 TAGTTAGGGT TAGATGCTCC AAGTTCTGGA CCTAATGAGT TTAGATGTTA
1801 TCTCCCCTGT TTGGCTCTGA AGAAGGGGAT AAGCATCGGT AGCCTGAAGA
1851 TTGCAATCCA CTCATTTGCA ATCTAACCTC TCTCCCTCCT GCATCTTTTG
1901 GATACTTTAA AAAATGACTG AGTGGGGAGG GGGGAATACT GAAATTTCTT
1951 CGGTGACTGC GGGACGTGGT TTCAGAAACT TTGCCCAAAC TTGGAAATGA
2001 GGGTGCCGAA AATTTTAGAG GGAAGTAGCT TTCTGCCTAG TGGATGCTTC
2051 TTCTAACCCC CTCCCCCAA CCCCAGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAATTAC
2101 CCCGGACTGT TCTGAAAAGT TTACAGTTTT TTTCCCTTTT GCCTCATTCC
2151 TGATTGTTAA CTTTCTGTAG AACAGTGAGG AACCCACAAT TGATTTAAAT
2201 TCTGAGATGC AATAAGAGCA AATTTCTAAA GTTTTTTTTT TTTAATTAGA
2251 TTTATCTCCA TTAGTCTTTG GGCAGAATTT TTTTAAATAA TAATAGCAGC
2301 TTGCGGTCCA ATTATTGTTA AAGTTATATG GATGATTCAT AAGACGTCTT
2351 CCTGACCAAA ATCTGAACAT TAAAAAGGAA GAAGGTGGGG GCGGGGGGGC

```

2401 TACTTGCAAA GATAATCTCG GTGGGTATGA TACAGGGATG TGTGTGTGTG
2451 TATGTGTGTG TGTGTATATA TATATATATA TATGTATATA TAACCATGAA
2501 ACGATAGTAA GTCCCCCTCC CACCTTGTTT CCCCCCGCC CCCAACCCCA
2551 ATACTTTTCT TGAGGCAGAC TTGGAAC TTT CCTGACTTTA GCGTTATTTT
2601 ATGCGTGTG TATACGGCCC CCTGGGCACA GCTCCTAGCC GCCCGCGACG
2651 CACTACTGCT CTGAGTTGCC CACCTTTTCGG AGCGAGGCGC TGCCTGACTG
2701 TCCCGGGACG TGGGCGCCGT GGAAAGTAGC CCTCGGAGAT TTCGAAAGAT
2751 CGCGGTGGCC GCGGGCGTCC TTTGGGTCTG GCGGATTGCA AAACGGCCCC
2801 TCGGGCGGGC TGCGCCTCGA GGCCGCGAGG GGCAGCGCCG GGCAGGGCCC
2851 GGTTGCTTTT TTGCTTTCAT TTTTCAGAAG TGCCTTTTCG GTGATCTGTT
2901 GCTGTATGTG TGTGTGTGAG TGTGTGTGTG TGTCTGTCTG TCTGTCTGTC
2951 TGTCTGGGTC TCTCTCTTTT TCTCTCTTTT CTTTCTCTCT CTCTTAAAGT
3001 CTACTTTTTT AACCCCTGTC ACAATAATC CCCGTACCCG CTACATGAAA
3051 CCGACATGTA AAAACATCCG TCGCATCCTG TTTTTGTCAG GTTCTTTAAT
3101 CTGCCCTTCG AGTCGCTGCA GGTTATGAAA TGGGACGAAT AAAAGTAAAC
3151 AGTCTAGTAA AAGTCAATGC AAGCTGCACG TGTTGTGTCT GGGTCACTGG
3201 TAACTGACAT TGATATGGCT GGAGCGCTCG GGCTTCTCGC TCTCGCCCTC
3251 CCTCCCCATC GCCCACCTCC CACCTCTTCA ATCTGGTCCC CCCCTCCACC
3301 CCTCGCCTTT CTCCACCCCT TCACTCCCTC TGATTTATTT TCTGCTTTTT
3351 CTCTGCCGTC TCTCCTCCAC GCTCACTCCC TCCCCATCCC CGCCGGGTCT
3401 CTTTCCCCTG CCGGTTCACT GCCTCCCTCC CCCTACCCAG CCGGCGCCGC
3451 CGGCTCACTT GCCCACCTCC CCACCCCTGT CTCCCCGAG CTGGGAATTG
3501 CTGGCTCCGC CAAGCAAAGA ACGGCCGCTG TCAGGTCTCG TACAAGACAG
3551 AACTGAGCAA GGAGGAGTGT TGCAGCACTG GCCGCTGAG CACCTCGTGG
3601 ACCGGAGGAG ACGTAAATGA CAACACGCTG TTCAAGTGA TGATTTTCAA
3651 CGGGGGCGCC CCCAATGCA TCCCTTGTA AGGTAGGGCT CTTCTCCCC
3701 AGTCTGCAGG CCCTCAGTAG AGGGCGTCTT ACCCTCAGCT TCCCCAGTGC
3751 CCAGCCGGGG TTTGGGACTG GAGGAGCTTT GTTCGTGGGT TCCCCCTAAC
3801 CACCCCCAGC CCTGGTAAGC CATTGCGGCT GAATCTCCTG TCACACACTA
3851 CAGGCAAAAC AAGGGTCGCC AGAGGTTCTC GGACTTCTTA GCCAAATGTG
3901 GCGGTGAAGC CAGCCAACCC TTGCTCTTTG AGGGAGATTT GGTAGGGAA
3951 TGCAGCCAC TGTCCCCAC CTTTCCCTCT TCTCAACTTC CGGGCAACAG
4001 CCTAGCCCCT TGGGCTCAGA CTCTTGCTG CAGGATTGCG CAAGGCACCC
4051 ACAGCCCTCC TGGCTAACCT GCATGGTGCC TGACCCTGGT TTTAATCCCT
4101 GCCTCTTTCC AACTCCTAGA AACGTGTGAG AACGTGGACT GTGGCCCCGG
4151 AAAAAATGC CGAATGAACA AGAAGAACA ACCCCGCTGC GTCTGTGCC
4201 CAGATTGTTT TAACATCACC TGGAAAGGCC CGGTGTGTGG GCTGGATGGA
4251 AAAACCTACC GCAACGAATG TGCCTCCTC AAGGCCAGAT GTAAAAGAGCA
4301 GCCAGAGCTG CAAGTCCAGT ACCAGGGCAA ATGTA AAAAGT AGGTCCTACC
4351 CGACCCCTCC TCCAGCCTTC TGCTTGAGGT AGACCCGCTG CAGGACCCCT
4401 GGGATGGGCG TAATAGCCTA ATAATAATA TATCAAATA AGGAACCCCT
4451 TCTAACTTTA TATTCTAAAG ATTCTTAAG AACTAAAGG TTCAACCTAG
4501 AGTCTTAGTT TTCTTTTAA AACTGCAGAG CTACCCAAGT GCGTTCCTAA
4551 AGCTGAATGC TTCTGTTTCA TGATTTTCCTT GAAACCGTCC AGTGGCTCAG
4601 TCCGGAAGAA GTTACCTATT AACGTGTTA ATATTAATGT TTTTCCCTCT
4651 TTGTTTCAGA GACCTGTCCG GATGTTTTCT GTCCAGGCAG CTCTACATGC
4701 GTGGTGGACC AGACTAATAA TGCTACTGT GTGACTTGTA ACAGAATTTG
4751 CCCAGAGCCC ACCTCCTCTG AACAGTATCT CTGTGGGAAT GATGGAGTGA
4801 CCTACCCAG TGCCTGTCAC CTGAGAAAAG CTACCTGCCT ACTGGGCAGA
4851 TCTATTGGAT TGGCCTATGA GGGAAAGTGT ATCAGTAGGT ATTCTGGATT
4901 GAGGAAGGAA AAGAGAAAAA GGCTATAATT GTGATAAAC TGTGAGCTTA
4951 ACCAATAAAT AAACCCAAA CTTCCAAA CTAGCTTCAT CAAAGTCGGT
5001 AAAGTGCAT GACCACCTTA AGGAAACCAT TGTCTTTTTT TTTTTTTACC
5051 ATGTCTTCT GGATACATTG GCATACATAT TGAAATGCCA GCAAGACACA
5101 GGAAACAATT TTCCTTCGTA GAAATCTAAG AACTCACTCA ATTTTACACA
5151 TTTTTTTAAG TGCTAGACTT GCTGGAAGCG AGAAATAATT ACTTAACAGT
5201 TCCTAAAATC TGTTATCAGA TTCTGATAAC TGATAGAATT CTTTCTTTTT
5251 TTTTAAAGAT CCCACTTGTG GGAAGTAATC AAATACATAT TTAATTGAAG
5301 GATACTATGA AATCCTGTTT TAAGAAAATA CTACAGTATT TTCATGCATT
5351 AAGCTAGTAT AGAGGAAACT AGGAGTTTTG AGTATGTGTG TGTGTGTTTC
5401 AGTTTTATAG AGTGTTTTTG CACAGTATTT CCATGAGCCC CATTAGTGAG

5451 TAATAAAATA TGTTTTATAT GTTTACATTT ATTCATTTAT TGATAGAAGG
5501 CTAGAGAAAAG GGGACAAGGT GAGGAGAATG GATTTACTTA TCACAGGTGT
5551 ATTATATCCT AGAAGCAAAG **TCCTGTGACG** **ATATCCAGTG** **CACTGGTGGA**
5601 **AAAAAGTGTT** **TATGGGACTT** **CAAGGTTGGC** **AGAGGCCGGT** **GTTCACTCTG**
5651 **CGGTGAGCTG** **TGCCCTGAGA** **GTAAGTCTGA** **GGAGCCTGTC** **TGTGCCAGTG**
5701 **ACAATGCCAC** **CTATGCTAGC** **GAGTGTGCCA** **TGAAGGAAGC** **GGCCTGCTCC**
5751 **TCGGGCGTGC** **TGCTGGAAGT** **GAAGCACTCC** **GGATCTTGCA** **ACTGTAAGTG**
5801 TGATGCTCTAA CCTTGCCGCA GTTTAAGGAT TTCCCAGGCA AGTCCTAGGG
5851 AATGGAGACT TAGAAAAGCA CGAAAACGTC CCCCAGATAA GCCCACTTCT
5901 GTTTAAGTTA GGTAGCTGCT AAAGTGCACC AGCAATTCAG CAATCCACAA
5951 AAAAAATCAC CTGAAATGTT TCGGGGCCTT TAGGACTTGT CTGATGATCA
6001 TCAACAAGAT CACCTCTAAA ATAGCCCATT CCAATCATCT GCCCGTAATT
6051 CCTTTTGTTT TAGTAGTGTG CTTTGCTGTT TGCTTTTATT AACACTTGAA
6101 TCTGAACTAA CTACCTCAAA GGTTTTTTTTT TTTTTTTTTTC TTTTTCAAAG
6151 ACAGCTTTCT GTCATCACAC ATAGGCTGCT GCTTTGCGCA GTTGCCCCTA
6201 CTAATAAAT TAAGGACCCA AAGCAGTTAT ACCTAGAACA CAAGAGCGCT
6251 TTTTATCTAA TTTCAGGAAT CTGCCCCGTA AACCTGAGCC ATTGATTCTT
6301 CAGAACTTTC TGCAGTTTTT GACTTCATAG ATAATGTTTT TAAAAAAAAA
6351 AAAAAAAAAA GTCTTTTTTAA AACTTGTTAC ATAACAGCAG ATGCCAAAAA
6401 CAAAACAGCA TCTTACTGCA AGTCACATAA AAATGCAACG CTGTAATATG
6451 GCTGTTACAG AGGGCTTTGA AAACATACAC TGAGCTGCCT TCTGCGCTGT
6501 TGTTGTCCGT ATTTAAACAG CAGCTCCCTT GTATTCCCC ATCTAGCCAT
6551 **TTCGGAAGAC** **ACCGAAGACG** **AGGAGGAAGA** **TGAAGACCAG** **GACCACAGCT**
6601 **TTCCTATATC** **TTCCATTCTA** **GAGTGGTAAA** **CCCTCCACCA** **ATGTTCAATG**
6651 **TTGACATAGC** **CTTTAGGC**

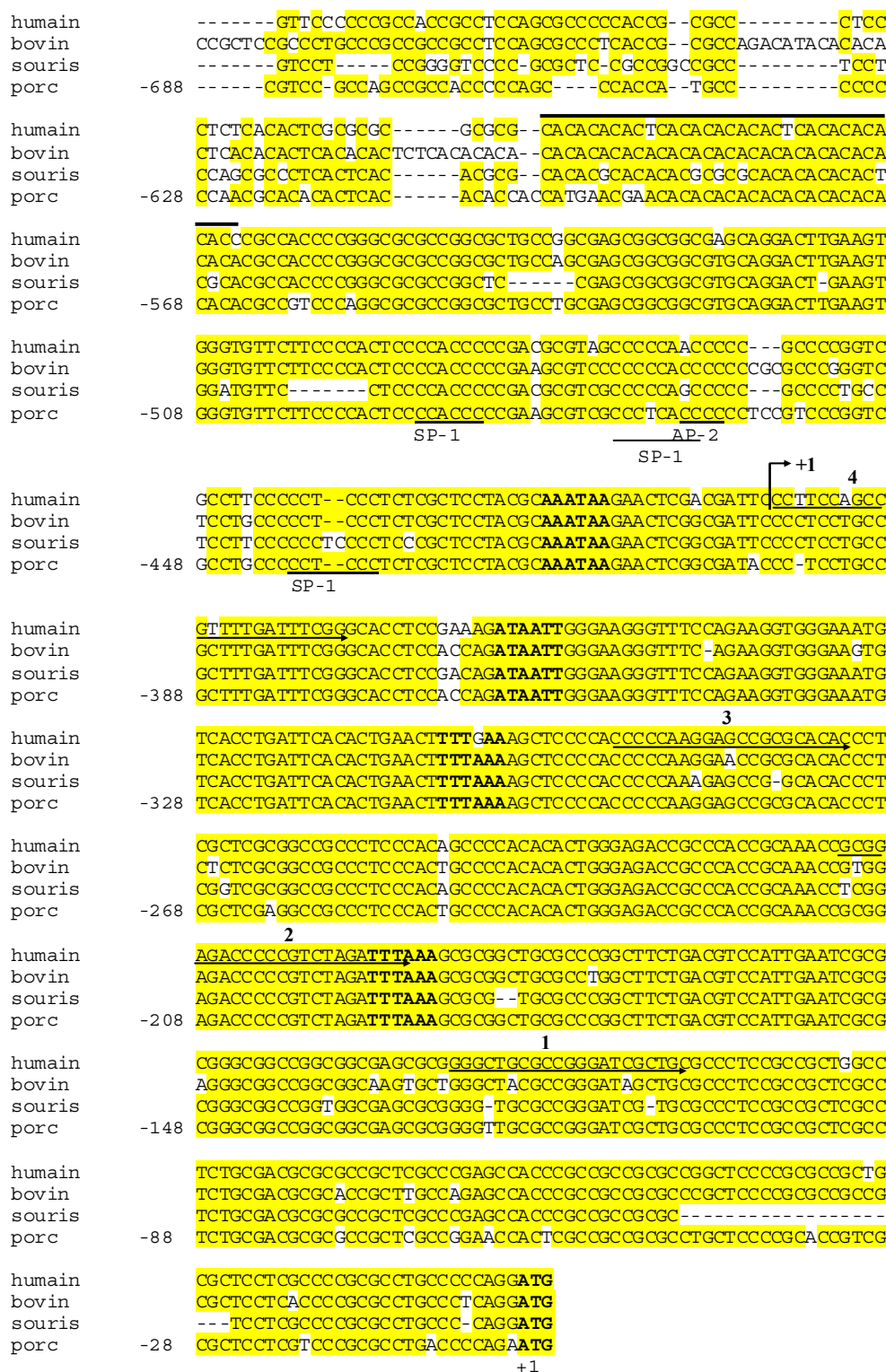


Figure 29: Alignement des régions promotrices des gènes *FST* humain, bovin, murin et porcin.

Les bases conservées sont surlignées en jaune. Le microsatellite à dinucléotides CA est indiqué par un trait noir épais. Les sites de liaison théoriques des facteurs de transcription, sont soulignés : AP-2 activator protein 2, SP-1 stimulating protein 1, Ebox. Les boîtes, TATA identifiées à partir de la séquence génomique murine (AF207743) sont écrites en caractères gras.

Le site de démarrage putatif de la transcription est indiqué par une flèche accolée du chiffre +1, et les trois oligonucléotides ayant permis sa détermination sont dessinés par des flèches noires portant les numéros 1, 2, 3, sur la séquence bovine.

```

souris      MTAPWAAALALLWGS LCAGS GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY
rat        MTAPWAAALALLWGS LCAGS GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY
humain    MTAPWVALALLWGS LWPGS GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCY
bovin     MTAPWAAALALLWGS LCAGS GRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGLERCEGERDKRLHCY

souris     ASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEPG
rat        ASWPNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEPG
humain    ASWANSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG
bovin     ASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCEGNFCNERFTHLPEAG

souris     GPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHEVRQCQR
rat        GPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHE-----
humain    GPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIGGLSLIVLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHE-----
bovin     GPEVTYEPPTAPTLLTVLAYSLLPIVGGLSLIALLLAFWMYRHRKPPYGHVDIHE-----

souris     WAGRDRGCADSFKPLPFQDPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAV
rat        -----DPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAV
humain    -----DPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAV
bovin     -----DPGPPPPSPLVGLKPLQLLEIKARGRFGCVWKAQLMNDFVAV

souris     KIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRG-SNLEVELWLI TAFHDKGSLTD
rat        KIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRGCSNLEVELWLI TAFHDKGSLTD
humain    KIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRG-SNLEVELWLI TAFHDKGSLTD
bovin     KIFPLQDKQSWQSEREIFSTPGMKHENLLQFIAAEKRG-SSLEAELWLI TAFHDKGSLTD

souris     YLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTA
rat        YLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTA
humain    YLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTA
bovin     YLKGNIITWNELCHVAETMSRGLSYLHEDVPWCRGEGHKPSIAHRDFKSKNVLLKSDLTA

souris     VLADFLGLAVRFEFGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWE
rat        VLADFLGLAVRFEFGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWE
humain    VLADFLGLAVRFEFGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWE
bovin     VLADFLGLAVRFEFGKPPGDTHGQVGTTRYMAPEVLEGAINFQRDAFLRIDMYAMGLVLWE

souris     LVSRC AADGPVDEYMLPFEEEIGQHP SLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHHPGLAQLCV
rat        LVSRC AADGPVDEYMLPFEEEIGQHP SLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHHPGLAQLCV
humain    LVSRC AADGPVDEYMLPFEEEIGQHP SLEELQEVVVHKKMRPTIKDHWLKHHPGLAQLCV
bovin     LVSRC AADGPVDEYMLPFEEEIGQHP SLEELQEVVVHKKMRPAIKDHWLKHHPGLAQLCV

souris     TIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLLPKESSI
rat        TIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGSTSDCLVSLVTSVTNVDLLPKESSI
humain    TIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLLPKESSI
bovin     TIEECWDHDAEARLSAGCVEERVSLIRRSVNGTTS DCLVSLVTSVTNVDLLPKESSI

```

Figure 30: Alignement des séquences protéiques du récepteur ActRIIB de la souris, du rat, de l'humain et du bovin.

Les acides aminés conservés des domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire, sont surlignés en gris clair, gris foncé et bleu respectivement. Le domaine kinase de la protéine est indiqué par une barre noire. En rouge, sont représentés les acides aminés qui peuvent être absents de la séquence protéique bovine suite à un épissage alternatif (Ethier *et al.*, 1997). La forme protéique murine présente une insertion de 24 acides aminés dans la région sous-membranaire, qui peut être excisée lors de la maturation différentielle des ARNm.

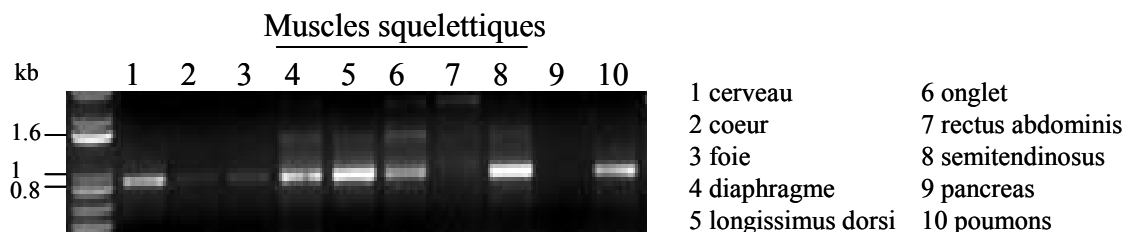


Figure 31 : Expression du gène *ACVR2B* par RT-PCR réalisée à partir d'ADNc extraits de différents tissus. (La région amplifiée recouvre les exons 2 à 7).

II Expression des gènes *ACVR2B* et *FST* bovins.

II.1. Expression tissulaire du gène *ACVR2B*.

L'expression du gène *ACVR2B* a été étudiée par RT-PCR dans différents tissus dont cinq tissus musculaires squelettiques. Les régions amplifiées par RT-PCR recouvrent les exons 2 à 7. Elles auraient dû permettre d'obtenir les deux types de transcrits décrits par Ethier *et al.*, (1997), qui diffèrent d'une séquence de 42 nucléotides situés au début de l'exon 5, codant pour une séquence peptidique riche en résidus Proline (Figure 30). Pourtant, seul le transcrit « long » possédant cette région a été amplifié. Les résultats obtenus présentés sur la Figure 31, indiquent une expression du gène *ACVR2B* dans tous les tissus étudiés, à l'exception du pancréas et d'un tissu musculaire squelettique, le *rectus abdominis*. La présence d'une seule isoforme exprimée dans ces différents tissus, pourrait s'expliquer d'une part, par une très faible expression de l'autre variant, indétectable par la technique utilisée, et d'autre part, par le fait que le transcrit « court » n'a été détecté par Ethier *et al.*, (1997) qu'à partir d'ADNc extraits de tissu provenant de *corpus lutea*.

II.2. Expression tissulaire du gène *FST*.

L'expression du gène *FST* bovin a été étudiée dans 13 tissus différents, dont 5 tissus musculaires squelettiques. Deux couples d'oligonucléotides ont été utilisés pour amplifier les deux types de transcrits préalablement décrits chez l'homme, le porc et la souris (Shimasaki *et al.*, 1988 ; Inouye *et al.*, 1991 ; Albano *et al.*, 1994). Ces transcrits alternatifs qui diffèrent par la taille de leur séquence codante et de leur extrémité 3', résultent de l'existence de deux sites donneurs d'épissage distants de 332 pb, qui conduisent à un changement de la longueur de l'intron 5 et de l'exon 6 (Figure 32).

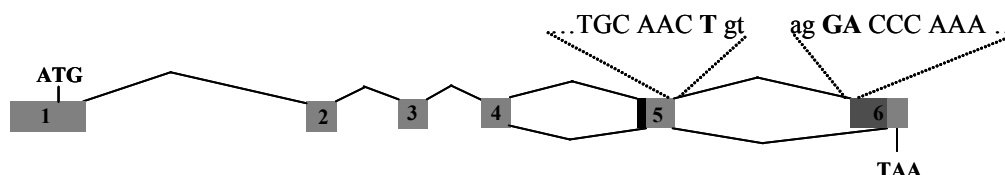


Figure 32 : Positions des deux mécanismes d'épissage alternatif du gène *FST*.

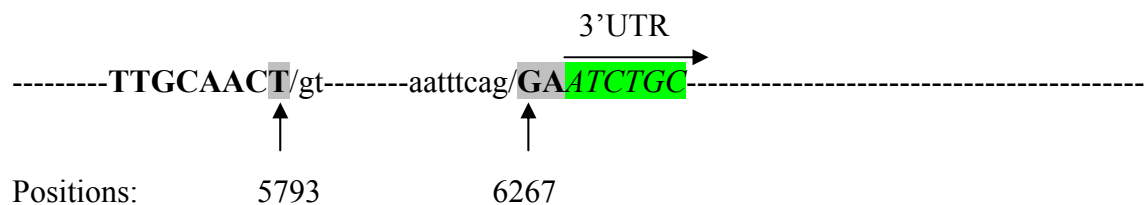
II.2.1. Mécanisme d'épissage du transcrit long.

La séquence nucléotidique de l'extrémité 3' du gène est représentée ci-dessous.

Le transcrit long possède une région codante plus courte du fait de la présence d'un codon stop prématuré TGA (surligné en gris) situé au début de l'exon 6, et une région 3'UTR plus longue (surlignée en vert). Cette séquence contient une partie de l'exon 6 non traduite qui est épissée lors de la formation du transcrit court.

5701	ACAATGCCAC	CTATGCTAGC	GAGTGTGCCA	TGAAGGAAGC	GGCCTGCTCC	} exon 5
5751	TCGGGCGTGC	TGCTGGAAGT	GAAGCACTCC	GGATCTTGCA	ACTGTAAAGTG	
5801	TGATGTCTAA	CCTTGCCGCA	GTTTAAGGAT	TTCCCAGGCA	AGTCCTAGGG	} intron 5
5851	AATGGAGACT	TAGAAAAGCA	CGAAAACGTC	CCCCAGATAA	GCCCACTTCT	
5901	GTTTAAGTTA	GGTAGCTGCT	AAAGTGCACC	AGCAATTCAG	CAATCCACAA	
5951	AAAAAATCAC	CTGAAATGTT	TCGGGGCCTT	TAGGACTTGT	CTGATGATCA	
6001	TCAACAAGAT	CACCTCTAAA	ATAGCCCATT	CCAATCATCT	GCCCGTAATT	
6051	CCTTTTGTTT	TAGTAGTGTG	CTTTGCTGTT	TGCTTTTATT	AACACTTGAA	
6101	TCTGAACTAA	CTACCTCAAA	GGTTTTTTTT	TTTTTTTTTTC	TTTTTCAAAG	
6151	ACAGCTTTCT	GTCATCACAC	ATAGGCTGCT	GCTTTGCGCA	GTTGCCCTTA	
6201	CTAACTAAAT	TAAGGACCCA	AAGCAGTTAT	ACCTAGAACA	CAAGAGCGCT	
6251	TTTTATCTAA	TTTCAGGAAT	CTGCCCCGTA	AACCTGAGCC	ATTGATTCTT	
6301	CAGAACTTTC	TGCAGTTTTT	GACTTCATAG	ATAATGTTTT	TAAAAAAAAA	} exon 6 et 3'UTR
6351	AAAAAAAAAA	GTCTTTTTAA	AACTTGTTAC	ATAACAGCAG	ATGCCAAAAA	
6401	CAAAACAGCA	TCTTACTGCA	AGTCACATAA	AAATGCAACG	CTGTAATATG	
6451	GCTGTTACAG	AGGGCTTTGA	AAACATACAC	TGAGCTGCCT	TCTGCGCTGT	
6501	TGTTGTCCGT	ATTTAAACAG	CAGCTCCCTT	GTATTCCCCC	ATCTAGCCAT	
6551	TCGGAAGAC	ACCGAAGACG	AGGAGGAAGA	TGAAGACCAG	GACCACAGCT	
6601	TTCTATATC	TTCCATTCTA	GAGTGGTAAA	CCCTCCACCA	ATGTTCAATG	
6651	TTGACATAGC	CTTTAGGC				

Le codon stop prématuré est constitué du dernier nucléotide de l'exon 5 (en position 5793) et des nucléotides GA situés en position 6266 et 6267 de la séquence nucléotidique.



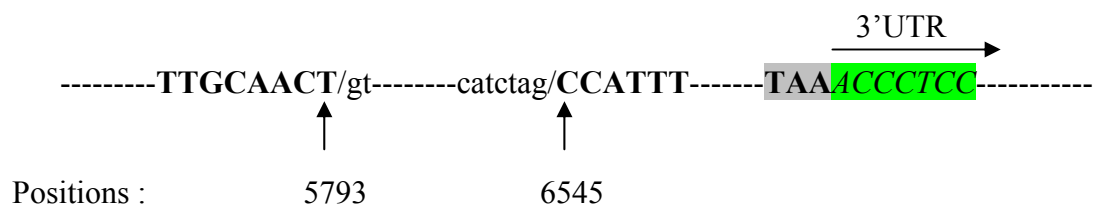
Ce codon stop prématuré génère une partie non codante du côté 3' d'environ 400 pb.

II.2.2 Mécanisme d'épissage du transcrit court.

Le transcrit court résulte de l'épissage de l'intron 5 et du début de l'exon 6, grâce à la reconnaissance du deuxième site accepteur, situé plus tardivement dans l'exon 6. Le site de terminaison de la traduction est marqué par le codon stop TAA surligné en gris. La partie 3'UTR, beaucoup plus courte que dans le cas du transcrit long, est surlignée en vert.

5701	ACAATGCCAC	CTATGCTAGC	GAGTGTGCCA	TGAAGGAAGC	GGCCTGCTCC	exon 5
5751	TCGGGCGTGC	TGCTGGAAGT	GAAGCACTCC	GGATCTTGCA	ACTGT AAGTG	}
5801	TGATGTCTAA	CCTTGCCGCA	GTTTAAGGAT	TTCCCAGGCA	AGTCCTAGGG	
5851	AATGGAGACT	TAGAAAAGCA	CGAAAACGTC	CCCCAGATAA	GCCCACTTCT	
5901	GTTTAAGTTA	GGTAGCTGCT	AAAGTGCACC	AGCAATTCAG	CAATCCACAA	
5951	AAAAAATCAC	CTGAAATGTT	TCGGGGCCTT	TAGGACTTGT	CTGATGATCA	
6001	TCAACAAGAT	CACCTCTAAA	ATAGCCCATT	CCAATCATCT	GCCCGTAATT	
6051	CCTTTTGT	TAGTAGTGTG	CTTTGCTGTT	TGCTTTTATT	AACACTTGAA	
6101	TCTGAACTAA	CTACCTCAA	GGTTTTTTTT	TTTTTTTTTTC	TTTTTCAAAG	
6151	ACAGCTTTCT	GTCATCACAC	ATAGGCTGCT	GCTTTGCGCA	GTTGCCCTA	
6201	CTAACTAAAT	TAAGGACCCA	AAGCAGTTAT	ACCTAGAACA	CAAGAGCGCT	
6251	TTTTATCTAA	TTTC AG GAAT	CTGCCCCTAA	AACCTGAGCC	ATTGATTCTT	}
6301	CAGAACTTTC	TGCAGTTTTT	GACTTCATAG	ATAATGTTTT	TAAAAAAAAA	
6351	AAAAAAAAAA	GTCTTTTTTA	AACTTGTTAC	ATAACAGCAG	ATGCCAAAAA	
6401	CAAAACAGCA	TCTTACTGCA	AGTCACATAA	AAATGCAACG	CTGTAATATG	
6451	GCTGTTACAG	AGGGCTTTGA	AAACATACAC	TGAGCTGCCT	TCTGCGCTGT	
6501	TGTTGTCCGT	ATTTAAACAG	CAGCTCCCCCT	GTATTCCCCC	ATCT AGCCAT	
6551	TTCGGAAGAC	ACCGAAGACG	AGGAGGAAGA	TGAAGACCAG	GACCACAGCT	
6601	TTCTATATC	TTCCATTCTA	GAGTGGTAAA	CCCTCCACCA	ATGTTCAATG	
6651	TTGACATAGC	CTTTAGGC				
						partie non traduite de l'exon 6
						exon 6
						3'UTR

Dans ce cas, les sites s'épissage sont situés en position 5793 et 6545 de la séquence nucléotidique.



II.2.3. Expression du gène *FST*.

Les résultats présentés ici, indiquent une expression du gène *FST* bovin dans tous les tissus étudiés à l'exception du cerveau, du cœur et d'un tissu musculaire squelettique, l'onglet (Figure 33). De façon surprenante, seule l'isoforme « courte » comprenant les exons 1 à 6 a été détectée, alors que le couple d'amorces utilisées, choisies dans l'exon 1 et dans l'exon 6 après le site de terminaison de la traduction TAA (Figure 32), auraient du permettre l'obtention des deux isoformes. L'isoforme « longue », a été détectée dans le cerveau, la rate, le rein, le testicule et les tissus musculaires squelettiques *Longissimus dorsi* et *semi tendinosus*, grâce à l'utilisation d'une amorce antisens spécifique, dessinée dans la partie non traduite de l'exon 6, après le site donneur d'épissage « GA » situé en position 6265 de la séquence nucléotidique du gène *FST* bovin.

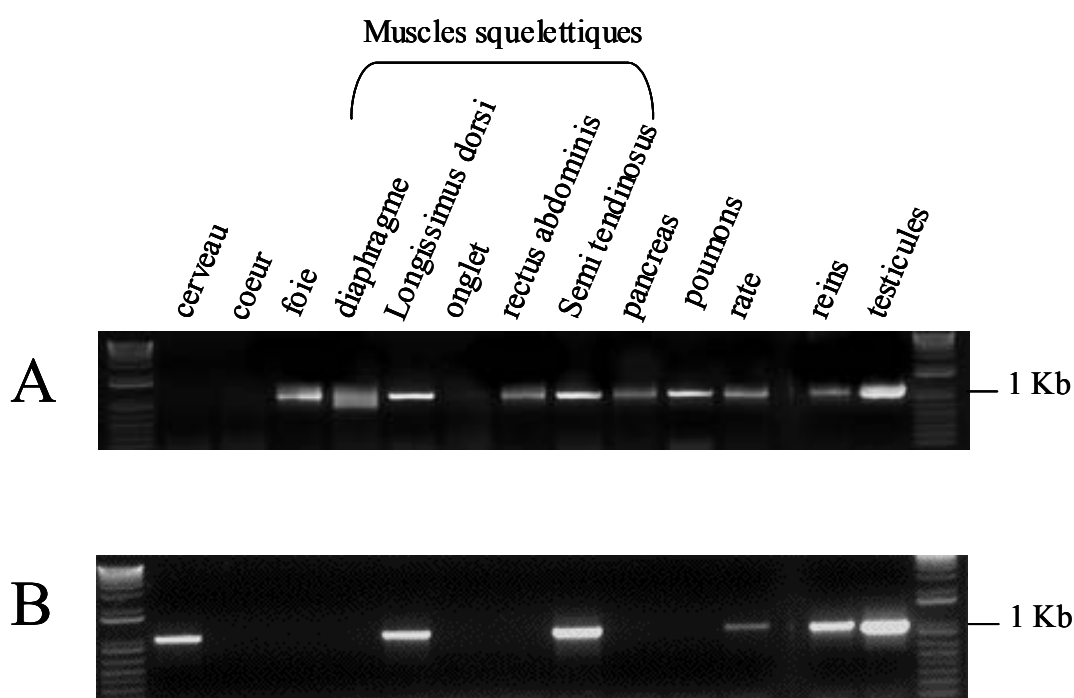


Figure 33 : Expression du gène *FST* bovin obtenue par RT-PCR à partir des ADNc de 13 tissus différents extrait d'un seul individu.

A : Amplification du transcrite court avec deux amorces choisies dans l'exon 1 et dans la partie traduite de l'exon 6 après le deuxième codon stop TAA. La forme protéique correspondante est FS-315.

B : Amplification du transcrite long avec deux amorces choisies dans l'exon 1 et dans la partie non traduite de l'exon 6, spécifique de ce transcrite. La forme protéique correspondante est FS-288.

Peptide signal

porc	MVRPKHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQA	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR
bovin	MARPRHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQA	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR
humain	MVRARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQA	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR
souris	MVCARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQA	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR
rat	MVCARHQPGGLCLLLLLLCQFMEDRSAQA	GNCWLRQAKNGRCQVLYKTELSKEECCSTGR

Domaine N-terminal

porc	LSTSWTEEDVNDNTL	FKWMI	FNGGAP	SCIP	CKETC	ENVDC	GPGKK	CRMN	KKNK	PRCV	CAP
bovin	LSTSWTEEDVNDNTL	FKWMI	FNGGAP	NCIP	CKETC	ENVDC	GPGKK	CRMN	KKNK	PRCV	CAP
humain	LSTSWTEEDVNDNTL	FKWMI	FNGGAP	NCIP	CKETC	ENVDC	GPGKK	CRMN	KKNK	PRCV	CAP
souris	LSTSWTEEDVNDNTL	FKWMI	FNGGAP	NCIP	CKETC	ENVDC	GPGKK	CRMN	KKNK	PRCV	CAP
rat	LSTSWTEEDVNDNTL	FKWMI	FNGGAP	NCIP	CKETC	ENVDC	GPGKK	CRMN	KKNK	PRCV	CAP

Domaine I

porc	D	C	S	N	I	T	W	K	G	P	V	C	G	L	D	G	K	T	Y	R	N	E	C	A	L	L	K	A	R	C	K	E	Q	P	E	L	V	Q	Y	Q	G	K	C	K	K	T	C	R	D	V	F	C	P	G	S	S	T	C	V
bovin	D	C	S	N	I	T	W	K	G	P	V	C	G	L	D	G	K	T	Y	R	N	E	C	A	L	L	K	A	R	C	K	E	Q	P	E	L	V	Q	Y	Q	G	K	C	K	K	T	C	R	D	V	F	C	P	G	S	S	T	C	V
humain	D	C	S	N	I	T	W	K	G	P	V	C	G	L	D	G	K	T	Y	R	N	E	C	A	L	L	K	A	R	C	K	E	Q	P	E	L	V	Q	Y	Q	G	R	C	K	K	T	C	R	D	V	F	C	P	G	S	S	T	C	V
souris	D	C	S	N	I	T	W	K	G	P	V	C	G	L	D	G	K	T	Y	R	N	E	C	A	L	L	K	A	R	C	K	E	Q	P	E	L	V	Q	Y	Q	G	K	C	K	K	T	C	R	D	V	F	C	P	G	S	S	T	C	V
rat	D	C	S	N	I	T	W	K	G	P	V	C	G	L	D	G	K	T	Y	R	N	E	C	A	L	L	K	A	R	C	K	E	Q	P	E	L	V	Q	Y	Q	G	K	C	K	K	T	C	R	D	V	F	C	P	G	S	S	T	C	V

Domaine II

porc	V	D	Q	T	N	N	A	Y	C	V	T	C	N	R	I	C	P	E	P	T	S	S	Q	Y	L	C	G	N	D	G	V	T	Y	S	S	A	C	H	L	R	K	A	T	C	L	L	G	R	S	I	G	L	A	Y	E	G	K	C	I	
bovin	V	D	Q	T	N	N	A	Y	C	V	T	C	N	R	I	C	P	E	P	T	S	S	E	Q	Y	L	C	G	N	D	G	V	T	Y	P	S	A	C	H	L	R	K	A	T	C	L	L	G	R	S	I	G	L	A	Y	E	G	K	C	I
humain	V	D	Q	T	N	N	A	Y	C	V	T	C	N	R	I	C	P	E	P	A	S	S	E	Q	Y	L	C	G	N	D	G	V	T	Y	S	S	A	C	H	L	R	K	A	T	C	L	L	G	R	S	I	G	L	A	Y	E	G	K	C	I
souris	V	D	Q	T	N	N	A	Y	C	V	T	C	N	R	I	C	P	E	P	S	S	S	E	Q	Y	L	C	G	N	D	G	V	T	Y	S	S	A	C	H	L	R	K	A	T	C	L	L	G	R	S	I	G	L	A	Y	E	G	K	C	I
rat	V	D	Q	T	N	N	A	Y	C	V	T	C	N	R	I	C	P	E	P	S	S	S	E	Q	S	L	C	G	N	D	G	V	T	Y	S	S	A	C	H	L	R	K	A	T	C	L	L	G	R	S	I	G	L	A	Y	E	G	K	C	I

Domaine III

porc	K	A	K	S	C	E	D	I	Q	C	T	G	G	K	C	L	W	D	F	K	A	G	R	G	R	C	S	L	C	D	E	L	C	P	E	S	K	S	E	P	V	C	A	S	D	N	A	T	Y	A	S	E	C	A	M	K	E	A
bovin	K	A	K	S	C	D	I	Q	C	T	G	G	K	C	L	W	D	F	K	V	G	R	G	R	C	S	L	C	G	E	L	C	P	E	S	K	S	E	P	V	C	A	S	D	N	A	T	Y	A	S	E	C	A	M	K	E	A	
humain	K	A	K	S	C	E	D	I	Q	C	T	G	G	K	C	L	W	D	F	K	V	G	R	G	R	C	S	L	C	D	E	L	C	P	D	S	K	S	E	P	V	C	A	S	D	N	A	T	Y	A	S	E	C	A	M	K	E	A
souris	T	-	K	S	C	E	D	I	Q	C	G	G	K	C	L	W	D	S	K	V	G	R	G	R	C	S	L	C	D	E	L	C	P	D	S	K	S	E	P	V	C	A	S	D	N	A	T	Y	A	S	E	C	A	M	K	E	A	
rat	K	A	K	S	C	E	D	I	Q	C	G	G	K	C	L	W	D	F	K	V	G	R	G	R	C	S	L	C	D	E	L	C	P	D	S	K	S	E	P	V	C	A	S	D	N	A	T	Y	A	S	E	C	A	M	K	E	A	

porc	A	C	S	S	G	V	L	L	E	V	K	H	S	G	S	C	N	S	I	S	E	D	T	E	E	E	E	E	E	D	Q	D	Y	S	F	P	I	S	S	I	L	E	W
bovin	A	C	S	S	G	V	L	L	E	V	K	H	S	G	S	C	N	S	I	S	E	D	T	E	E	E	E	E	E	D	Q	D	Y	S	F	P	I	S	S	I	L	E	W
humain	A	C	S	S	G	V	L	L	E	V	K	H	S	G	S	C	N	S	I	S	E	D	T	E	E	E	E	E	E	D	Q	D	Y	S	F	P	I	S	S	I	L	E	W
souris	A	C	S	S	G	V	L	L	E	V	K	H	S	G	S	C	N	S	I	S	E	E	T	E	E	E	E	E	E	D	Q	D	Y	S	F	P	I	S	S	I	L	E	W
rat	A	C	S	S	G	V	L	L	E	V	K	H	S	G	S	C	N	S	I	S	E	E	T	E	E	E	E	E	E	D	Q	D	Y	S	F	P	I	S	S	I	L	E	W

Queue acide C-terminale

Figure 34 : Alignement des séquences protéiques de la forme longue FS-344 de la follistatine du porc, du bovin, de l'humain, de la souris et du rat.

Les acides aminés conservés des domaines N-terminal, I, II, III et C-terminal, sont surlignés en gris foncé, gris clair, vert, vert foncé et gris foncé, respectivement. Les sites de N-glycosylation sont indiqués en jaune. En rouge, sont indiquées les résidus Cystéine dont l'alignement est parfaitement conservé entre les différentes espèces. Ces acides aminés forment des ponts disulfures au sein de chaque domaine de la protéine, permettant à ceux-ci de former une unité de repliement autonome.

Un variant supplémentaire a également été identifié pour le gène *FST* bovin, résultant de l'épissage des trois premiers nucléotides de l'exon 5 (Figure 35). Ce transcrit alternatif a été observé par séquençage direct des produits de RT-PCR obtenus à partir de tissu testiculaire et de tissu musculaire squelettique *semitendinosus*, indépendamment des isoformes « courte » et « longue » des transcrits décrits précédemment. Ces résultats ont par la suite été confirmés par le clonage des produits de RT-PCR suivi du séquençage de plusieurs clones d'ADNc. Cet épissage alternatif a déjà été décrit chez la souris (NM_008046, Albano *et al.*, 1994) et existe aussi chez l'homme et le porc même s'il n'a jamais été décrit, puisque des EST dépourvues de ces trois nucléotides sont présentes dans les banques de données (BG611854 et CK465787 pour l'homme et le porc, respectivement). L'utilisation de ce site donneur d'épissage supplémentaire conduit à la substitution de deux résidus Lys²⁴¹ et Ala²⁴² par un résidu Thr²⁴¹ dans la séquence protéique (Figure 34). Ces trois acides aminés, surlignés en noir, sont situés entre les domaines FS-II (en vert) et -III (en vert foncé) de la protéine. Cette figure permet également d'observer les fortes homologues de séquence existant entre les séquences protéiques du porc, du bovin, de l'humain, de la souris et du rat. Notamment, elle illustre l'alignement parfait des résidus Cystéine qui forment des ponts intrachainés et assurent un repliement correct de la protéine.

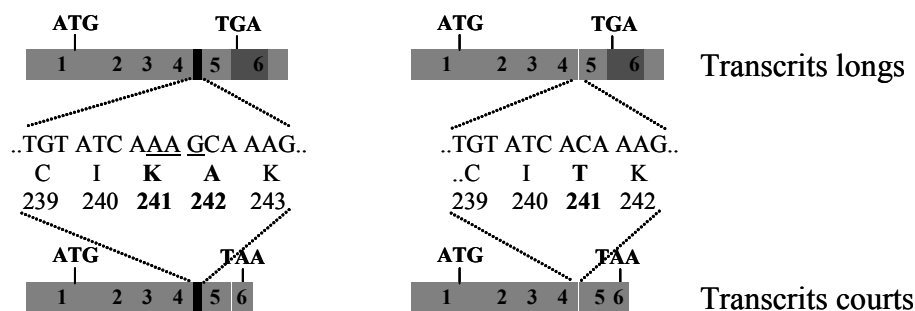


Figure 35 : Transcrits alternatifs du gène *FST*.

La partie grisée de l'exon 6 est épissée dans le transcrit court. Cette partie contient le codon stop qui est utilisé lors de la traduction du transcrit long, et qui donne une protéine plus courte. Sont également indiqués les changements dans la séquence protéique induit par l'épissage alternatif qui a lieu au début de l'exon 5 : les deux acides aminés K (Lys) et A (Ala) sont remplacés par un résidu T (Thr).

	Bazadaises	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N.P	18,2	18,2	17,9	17,5	12,5	11,4	5,7	4,3	3,9	3,2	2,9	0,7
ACVR2B	1076del ACACGC	del/del	ins/del	del/del	ins/ins	del/del	del/del	ins/ins	del/del	del/del	del/del	ins/del	ins/del
	C1593T	T/T	C/T	T/T	C/C	T/T	T/T	C/C	T/T	T/T	T/T	C/T	C/T
	G1559T	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	G/G
	A1565G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
	G1594A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G
	G1596A	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	G1622A	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	C1845T	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
	C1972T	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
	A5025G	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
	C5031G	C/C	C/C	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
C5198T	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	
G5600A	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	

Tableau 8: Génotypes des 12 individus de race Bazadaise, établis à partir des différents polymorphismes détectés dans la séquence du gène *ACVR2B*.

N.P. : Note Phénotypique, estimée à partir du développement musculaire des individus.

del, ins : délétion ou insertion des 6 nucléotides ACACGC, respectivement.

La seconde colonne représente la position des SNPs indiquée à partir des séquences nucléotidiques de référence du gène *ACVR2B* bovin (AY775793 et AY775794).

Races	N.P.	1076delACACGC	C1593T
Bazadaise	18,2	del/del	T/T
	18,2	del/ins	T/C
	17,9	del/del	T/T
	17,5	ins/ins	C/C
	12,5	del/del	T/T
	11,4	del/del	T/T
	5,7	ins/ins	C/C
	4,3	del/del	T/T
	3,9	del/del	T/T
	3,2	del/del	T/T
	2,9	del/ins	T/C
0,7	del/ins	T/C	
Angus		del/del	T/T
		del/ins	T/C
		del/del	T/T
Charolaise		del/del	T/T
		del/del	T/T
		del/del	T/T
Limousine		del/del	T/T
		del/ins	T/C
		del/del	T/T

Tableau 9: Résultat du séquençage de la région 5' du gène *ACVR2B* chez 21 individus de race bovine Bazadaise, Angus, Charolaise et Limousine.

La délétion de 6 pb « ACACGC » détectée en position 1076 dans la région promotrice du gène *ACVR2B* est toujours associée au nucléotide T situé en position 1593 de la région 5'UTR. Inversement, la présence des 6 nucléotides est systématiquement associée à une base C. Les notes phénotypiques, de 0 à 20, représentent la masse musculaire des animaux. Elles résultent de la moyenne d'observations visuelles effectuées sur les animaux vivants et sur leurs carcasses après abattage.

N.P. : Note Phénotypique ; del : délétion ; ins : insertion.

III.1. Identification de polymorphismes dans les gènes *ACVR2B* et *FST*.

La recherche de polymorphismes dans les gènes *ACVR2B* et *FST* a été réalisée sur un panel de 12 animaux de race Bazadaise, choisis pour leurs caractéristiques phénotypiques de fort développement musculaire notées de 0 à 20, sans qu'aucune mutation dans le gène codant la myostatine, connue pour être responsable de l'hypertrophie musculaire ne soit associée (voir tableau 13 dans Matériels & Méthodes). La totalité des deux gènes, à l'exception de l'intron 1 du gène *ACVR2B*, a été amplifiée par PCR, analysée par la technique SSCP (voir Matériels & Méthodes) puis séquencée.

III.1.1. Polymorphismes détectés dans le gène *ACVR2B* bovin.

Onze polymorphismes ont ainsi été détectés dans le gène *ACVR2B*, tous localisés dans les parties introniques du gène, excepté un, localisé dans l'exon 6 mais qui ne change pas l'acide aminé dans la séquence protéique (Figure 24 ; Tableau 8). Deux polymorphismes supplémentaires ont également été mis en évidence dans la région 5' du gène : une délétion de 6 pb située en position 1076 de la séquence génomique (annexe 1), et la substitution d'un nucléotide C par un nucléotide T en position 1593 de la région 5'UTR. Les résultats du séquençage de la région 5' du gène des 12 individus de race Bazadaise et de 9 individus de race Angus, Charolaise et Limousine, sont présentés dans le Tableau 9.

Tous les allèles séquencés montrent une association systématique de la délétion des 6 nucléotides ACACGC avec la présence d'un T en position 1593, et inversement, le nucléotide C est toujours associé à la présence de ces 6 pb. Deux individus seulement, sur les 21 génotypés, sont homozygotes pour l'insertion ACACGC. Dans la race bovine, l'allèle délété des 6 pb est majoritaire à 75%. L'influence de ces deux polymorphismes sur l'activité transcriptionnelle du promoteur *ACVR2B* a été étudiée. Ces résultats sont présentés plus loin.

	Bazadaises	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	N.P.	18,2	18,2	17,9	17,5	12,5	11,4	5,7	4,3	3,9	3,2	2,9	0,7
<i>FST</i>	825(CA) _n	309/309	309/309	313/313	309/313	309/313	309/311	309/311	309/309		309/309	309/311	309/309
	2439 (TG) _n (TA) _n	279/290	279/290	279/290	279/290		279/290	279/290		279/290		279/290	279/290
	G3943A	A/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	A/A	G/A	G/A	G/G	A/A
	T5269G	T/G	T/T	T/G	T/G	T/G	T/G	T/G	T/G	T/T	T/G	T/G	T/T
	T5313C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
	G5324A	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
	T5805G	T/G	T/T	T/T	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T
	G6045C	G/C	G/G	G/G	G/C	G/C	C/C	C/C	G/G	C/C	G/C	C/C	G/G

Tableau 10: Génotypes des 12 individus de race Bazadaise, établis à partir des différents polymorphismes détectés dans la séquence du gène *FST*.

N.P. : Note Phénotypique, estimée à partir du développement musculaire des individus.

La seconde colonne représente la position des SNPs indiquée à partir de la séquence nucléotidique de référence du gène *FST* bovin (AY775795).

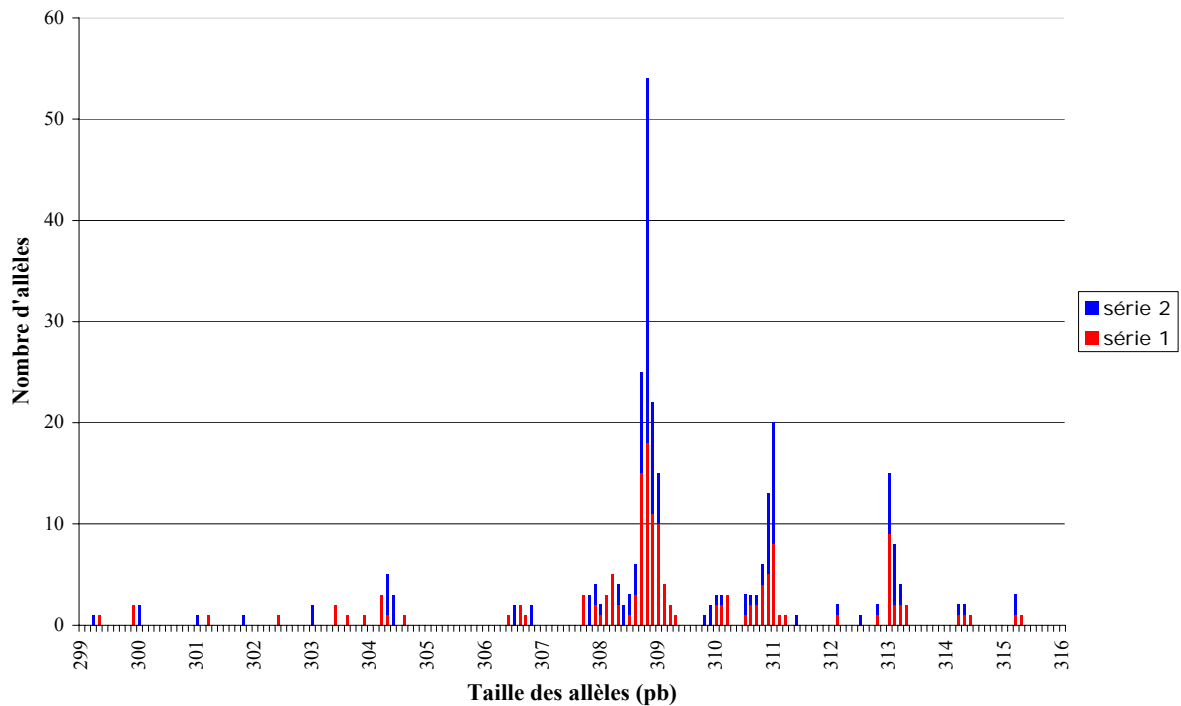


Figure 36: Variabilité des allèles du microsatellite localisé dans le promoteur du gène *FST* bovin.

Deux tests de génotypage ont été réalisés, représentés en rouge, « série 1 » et en bleu, « série 2 ». En abscisses sont indiquées les valeurs des allèles des 76 individus à une décimale près ; en ordonnées, la fréquence de chaque valeur obtenue.

III.1.2. Polymorphismes détectés dans le gène *FST* bovin.

Les résultats du séquençage des 12 individus de race Bazadaise pour le gène *FST* bovin ont mis en évidence 6 SNPs, localisés exclusivement dans les introns, ainsi que deux microsatellites (Figure 27: ; Tableau 10).

Le microsatellite situé dans le promoteur en position 825 de la séquence génomique (annexe 2), est un microsatellite à dinucléotides CA. Afin d'estimer le caractère polymorphe de ce microsatellite, 76 individus de races bovines différentes, ont été génotypés. Les PCR réalisées avec une amorce sens marquée par un fluorochrome 6-FAM™ (bleu) ont permis d'amplifier un fragment de 318 pb contenant le microsatellite (voir Matériels & Méthodes). Les positions des deux oligonucléotides, choisis à partir de la séquence génomique du gène *FST* bovin, sont présentées ci-dessous :

```

701 TGAGGAGCGG CGTTGCGAAG ACCAACTCCC GCCCCGCCGC CCCGCTCCGC
751 TCCGCCCTGC CCGCCGCCGC CTCCAGCGCC CTCACCGCGC CAGACATACA
801 CACACTCACA CACTCACACA CTCTCACACA CACACACACA CACACACACA
851 CACACACACA CACACACGCC ACCCCGGGCG CGCCGGCGCT GCCAGCGAGC
901 GGCGGCCTGC AGGACTTGAA GTGGGTGTTT TTCCCCACTC CCCACCCCCG
951 AAGCGTCCCC CCCACCCCCC CGCGCCCGGG TCTCCTGCCC CCTCCCTCTC
1001 GCTCCTACGC AAATAAGAAC TCGGCGATTG CCCTCCTGCC GCTTTGATTT

```

Les résultats du séquençage de ces produits d'amplification, ont été analysés grâce au système GeneScan ABIPrism® 310 (voir Matériels & Méthodes). La taille estimée des différents allèles obtenus varie de 299 pb à 315 pb et correspond à un nombre de répétitions de dinucléotides CA, de 12 à 21. Les valeurs brutes résultants des deux tests de génotypage réalisés à partir des mêmes échantillons, et correspondant aux différentes valeurs alléliques du microsatellite, sont représentées sur le graphe de la Figure 36. Ces valeurs approximatives sont estimées à partir des tailles standard du marqueur de taille, variant de 35 pb à 500 pb, que l'on fait migrer parallèlement.

La dispersion des valeurs reportées sur ce graphe autour des valeurs exactes mentionnées sur l'axe des abscisses, peuvent s'expliquer, d'une part, par les conditions aléatoires liées à la technicité, et d'autre part, par la structure même du microsatellite,

[(CA)₃CT(CA)₃CT(CA)₃(CT)₂(CA)₂₁], qualifié d'imparfait. Les interruptions des répétitions CA par les dinucléotides TG, peuvent perturber l'analyse informatique effectuée par le logiciel.

Neuf allèles distincts, résumés dans le Tableau 11: ci-dessous, ont été identifiés, parmi les 76 individus génotypés, l'allèle majoritaire à 53% étant constitué de 18 CA.

Les individus de race Bazadaise, caractérisés pour leur développement musculaire, possèdent l'allèle majoritaire de 309 pb à 70%. Cette forte fréquence, indépendante des caractéristiques phénotypiques des animaux, ne permet donc aucune association directe entre la taille du microsatellite et la note phénotypique (Tableau 10).

		299	301	303	305	307	309	311	313	315
Bazadaises	11						15	3	4	
Limousines	12	1					19	1	3	
Charolaises	14		1			1	10	13	3	
Angus	6				1		8		1	2
Parthenaises	3						3	2		1
Maine-Anjous	2		1				2			1
Gasconnes	2						4			
Bl d'Aquitaines	7	2				1	6	4	1	
INRA	4					2	3	3		
Holsteins	5				3		4		3	
Montbelliardes	5					1	4	2	2	
Normandes	5			5			2	3		
Total Individus	76	1,97%	1,31%	3,28%	2,63%	3,28%	53,28%	20,39%	11,18%	2,63%

Tableau 11: Fréquence allélique des différents allèles du microsatellite situé dans la région promotrice du gène *FST* bovin.

Sur la colonne de gauche, sont représentés le nombre d'individus par race qui ont été génotypés. Sur la ligne du bas, sont représentées les fréquences alléliques. Ainsi, 76 individus de 12 races bovines différentes ont été génotypés et ont permis d'identifier 9 allèles distincts, dont la taille varie de 299 pb à 315 pb, ce qui représente une variation de 12 à 21 du nombre de répétition des dinucléotides CA. L'allèle majoritaire d'une longueur de 309 pb à une fréquence allélique de 53%.

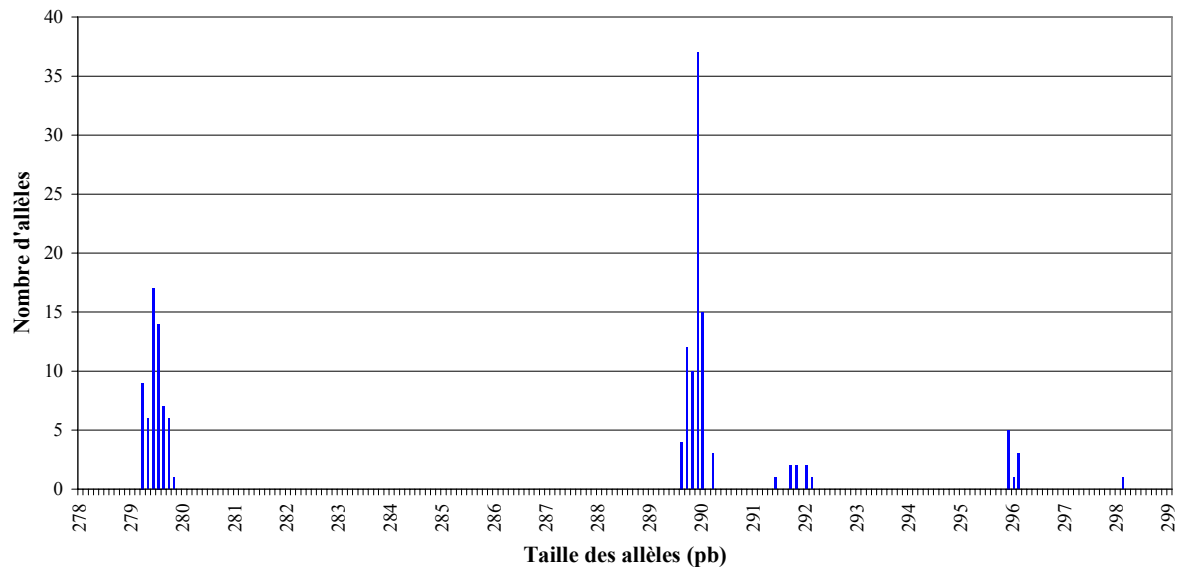


Figure 37 : Variabilité des allèles du microsatellite localisé dans l'intron 1 du gène *FST* bovin.

En abscisses sont indiquées les valeurs des allèles des 80 individus à une décimale près ; en ordonnées, la fréquence de chaque valeur obtenue.

		279	290	292	296	298
Bazadaises	9	9	9			
Limousines	17	21	8	5		
Charolaises	20	11	28			
Angus	3	1	5			
Gasconnes	2	3	1			
Parthenaises	3	2	4			
Maine-Anjou	3	3	1	1		1
Bl. D'Aquitaines	7	3	9	2		
INRA	4	2	6			
Holsteins	5	2	5		3	
Montbelliardes	3	2	4			
Normandes	4	1	2		5	
Total Individus	80	37%	51,25%	5%	5,60%	0,60%

Tableau 12: Fréquence allélique des différents allèles du microsatellite situé dans l'intron 1 du gène *FST* bovin.

80 individus de 12 races bovines différentes ont été génotypés et ont permis d'identifier 5 allèles distincts, dont la taille varie de 279 pb à 298 pb.

Un second microsatellite a été détecté dans l'intron 1 du gène *FST* bovin. Quatre vingt individus de races bovines différentes ont été génotypés afin de mettre en évidence les différents allèles existant au sein de cette population. Les PCR réalisées avec une amorce sens marquée par un fluorochrome VIC™ (vert) ont permis d'amplifier un fragment de 290 pb contenant le microsatellite (voir Matériels & Méthodes). Les positions des deux oligonucléotides, choisis à partir de la séquence nucléotidique du gène *FST* bovin, sont présentées ci-dessous :

```

2251 TTTATCTCCA TTAGTCTTTG GGCAGAATTT TTTTAAATAA TAATAGCAGC
2301 TTGCGGTCCA ATTATTGTTA AAGTTATATG GATGATTCAT AAGACGTCTT
2351 CCTGACCAAA ATCTGAACAT TAAAAAGGAA GAAGGTGGGG GCGGGGGGGC
2401 TACTTGCAA GATAATCTCG GTGGGTATGA TACAGGGATG TGTGTGTGTG
2451 TATGTGTGTG TGTGTATATA TATATATATA TATGTATATA TAACCATGAA
2501 ACGATAGTAA GTCCCCCTCC CACCTTGTTT CCCCCCGCC CCCAACCCCA
2551 ATACTTTTCT TGAGGCAGAC TTGGAAC TTT CCTGACTTTA GCGTTATTTT

```

La taille estimée des cinq allèles obtenus varie de 279 pb à 298 pb. La structure particulière de ce microsatellite, [(TG)₆TA(TG)₆(TA)₉TG(TA)₄], ne nous permet pas de dire quel type de répétition à deux dinucléotides, TG ou TA, est responsable de la variation des tailles alléliques déterminées. Les valeurs alléliques obtenues, beaucoup moins dispersées que dans le cas précédent, sont présentées sur le graphe de la Figure 37.

Les résultats obtenus sont en accord avec la structure même du microsatellite, qui prédit une représentation allélique peu polymorphe à cause du nombre restreint de répétitions successives.

Tous les individus de race Bazadaise séquencés sont hétérozygotes pour les allèles 279 et 290, majoritaires à 37% et à 51% respectivement, ce qui représente une variation de 5 dinucléotides (Tableau 12). Il est intéressant de noter, toutefois, qu'un individu de la race Maine-Anjou possède deux allèles distincts de 10 répétitions, dont un allèle de 298 pb, unique dans ce panel d'animaux étudiés, et qui présente un nombre de répétition supérieure à celui présenté dans la séquence de référence.

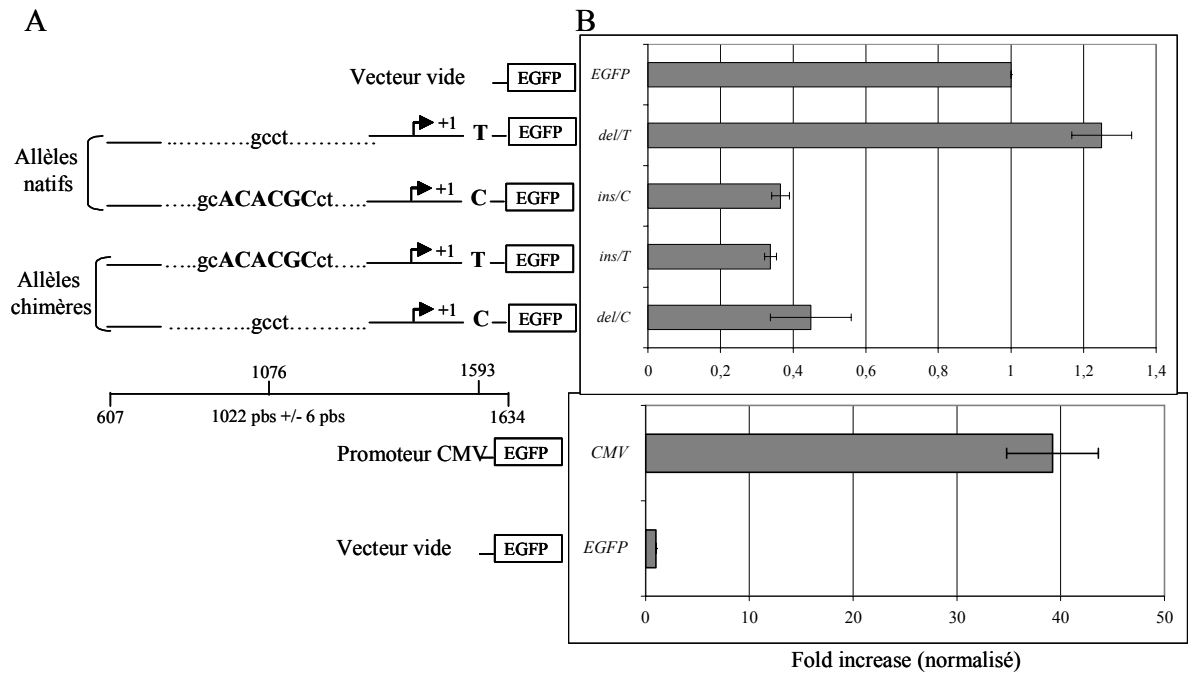


Figure 38 : Analyse de l'expression transitoire du promoteur du gène *ACVR2B* bovin.

A : 4 constructions ont été utilisées, recouvrant les nucléotides 607 à 1634 (AY775794), clonées devant le gène rapporteur EGFP. Cette séquence contient les 700 pb situées en amont du site putatif de démarrage de la transcription et 328 pb en amont de la région 5'UTR. Ces 4 constructions diffèrent entre elles au niveau des 2 polymorphismes détectés dans cette région (1076delACACGC et C1593T).

B : Moyenne des valeurs d'activité obtenues pour les transfections des 4 constructions dans les cellules COS-7. Ces transfections ont été réalisées 4 fois par construction et de manière indépendante. Ces valeurs sont normalisées par rapport à l'activité du vecteur pEGFP-1 vide qui sert de contrôle négatif. Le vecteur CMV représente le contrôle positif.

IV. Analyse fonctionnelle de la région promotrice du gène ACVR2B.

Afin d'étudier l'influence des deux polymorphismes, 1076delACACGC et C1593T détectés dans la région 5' du gène *ACVR2B*, sur l'activité transcriptionnelle de la région promotrice, nous avons cloné dans le vecteur d'expression pEGFP-1 (Clontech), une partie de la séquence promotrice, du nucléotide 607 au nucléotide 1634, en amont d'un gène rapporteur, l'EGFP (Enhancer Green Fluorescent Protein). Quatre constructions ont ainsi été transfectées dans des cellules COS-7. Deux reproduisent les haplotypes observés chez les individus séquencés, et les deux autres, représentent des constructions chimères des deux polymorphismes détectés. Les résultats de l'activité du promoteur, observés par cytométrie en flux et représentés sur la Figure 38, révèlent que les deux haplotypes observés chez les individus séquencés (1076insACACGC/1593C et 1076delACACGC/1593T) varient de 0,4 à 1,2 par rapport à la valeur témoin caractérisée par l'activité de l'EGFP seule. L'activité témoin, obtenue par transfection des cellules COS-7 par le vecteur natif, sans promoteur, s'avère relativement élevée. Cette fluorescence pourrait résulter d'une activité promotrice endogène basale présente sur le plasmide. Les résultats obtenus avec les constructions chimères, indiquent une activité sensiblement identique de 0,4, ce qui suggère une action synergique de ces deux polymorphismes dans l'activité du promoteur.

Le témoin positif est représenté par l'activité du promoteur CMV (*Cytomégalo*virus), placé en amont du gène rapporteur EGFP. Son activité très importante par rapport au témoin négatif (40 fois supérieure), nous a contraint de présenter les résultats séparément.

Discussion

La myostatine est une protéine sécrétée et circulante, très conservée chez les vertébrés, et produite essentiellement dans le muscle squelettique (Kocamis and Killefer, 2002; McPherron *et al.*, 1997). Elle exerce ses effets de façon paracrine et endocrine, en interagissant avec le récepteur ActRIIB, situé à la surface des cellules musculaires, afin d'activer une cascade de signalisation intracellulaire. Plusieurs mutations, détectées dans la séquence du gène codant la myostatine, provoquent un dysfonctionnement de la protéine qui a pour conséquence une absence de régulation de la masse musculaire. Les bovins de certaines races comme la BBB, marqués par ce fort développement musculaire représentent une plus value commerciale pour les producteurs et les industriels de la distribution à cause de la valorisation jugée parfois exceptionnelle de leur viande en boucherie, qui posséderait des propriétés organoleptiques favorables. Cependant, le phénotype « hypermusclé » observé dans d'autres races bovines n'est pas systématiquement associé aux mutations causales déjà identifiées, suggérant l'existence d'autres mutations, et/ou l'implication d'un mécanisme différent, et/ou l'implication d'autres protéines de la voie de signalisation de la myostatine.

Dans le cadre de notre étude nous avons opté pour une stratégie de gènes candidats et préférentiellement dirigé nos recherches sur l'étude de deux gènes qui codent des protéines partenaires de la myostatine en amont de la voie de signalisation, le gène codant le récepteur de la myostatine, *ACVR2B*, et le gène *FST* codant la follistatine, une protéine qui se complexe avec la myostatine et qui régule sa fixation sur le récepteur.

Ainsi, nous avons tenté de mettre en évidence des polymorphismes dans la séquence du gène *ACVR2B*, susceptibles de modifier, voire d'annuler l'activité inhibitrice de la myostatine. Aucune mutation pouvant modifier la structure de la protéine bovine ActRIIB n'a été détectée, mais deux clusters de SNPs dans les introns 5 et 10 ont été identifiés parmi les 12 Bazadaises étudiées. Aucun lien direct n'a pu associé ces polymorphismes avec les notes phénotypiques d'hypertrophie musculaire. Cependant, leur position dans la séquence du gène pourrait modifier les séquences consensus d'épissage, nécessaires à la reconnaissance des sites donneurs et accepteurs lors de l'excision des introns. En effet, ces mutations rassemblées à la fin de l'intron 5 et au début de l'intron 10, pourraient perturber les mécanismes d'excision des exons adjacents. Deux transcrits ont été décrits chez le bovin, exprimés dans le tissu extrait du *corpus lutea*. Ces deux isoformes résultent de l'épissage alternatif de 42

nucléotides, qui codent pour 14 acides aminés situés sous la région transmembranaire, dont une majorité sont des résidus Proline. Par la présence de ces clusters d'acides aminés, cette région ressemble aux domaines SH3, identifiés comme des sites possibles d'interaction avec des protéines intracellulaires (Alexandropoulos *et al.*, 1995), et de ce fait, médiateurs de signaux intracellulaires. Dans nos travaux, le transcrit court n'a pas été détecté dans les différents tissus étudiés, alors que différentes stratégies utilisant différents couples d'oligonucléotides spécifiques, ont été mise en place. Cela peut être dû à sa trop faible quantité, mais aussi à une expression étroitement spécifique d'un tissu non représenté. De manière identique, l'existence d'autres transcrits, a pu être occultée, à cause d'une trop faible expression. Il aurait été également approprié d'analyser la nature et le niveau d'expression des transcrits exprimés chez les individus de race Bazadaise dont les caractéristiques d'hypertrophie musculaire sont connues. Malheureusement, les tissus correspondants n'étaient pas disponibles. De façon surprenante, aucune amplification des transcrits *ACVR2B* n'a été obtenue dans le tissu cardiaque, alors que les travaux de Sharma *et al.*, (1999), ont montré l'expression des transcrits de myostatine dans le tissu cardiaque de mouton. Cette absence d'amplification, peut être relative à la qualité des ARNm, pourrait spécifier le rôle du récepteur ActRIIB dans la voie de signalisation de la myostatine, au tissu musculaire squelettique. De ce fait, l'expression quasi ubiquitaire de la forme « longue » du gène *ACVR2B*, reflète certainement son rôle dans la voie de signalisation de l'activine A, qui est un facteur de croissance et de différenciation, exprimé dans de nombreux types cellulaires (Zimmerman and Mathews, 2001).

Nous avons également caractérisé la région promotrice du gène *ACVR2B*. Un îlot CpG et différents sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription ont été identifiés et semblent très conservés, en comparaison avec les séquences humaine et murine, déjà décrites dans la littérature. Un polymorphisme (1076delACACGC) situé dans le promoteur putatif a été détecté. Il est associé à un autre SNP situé dans la partie 5' non traduite du gène. Après une analyse structurale de cette région par des logiciels informatiques de type NIX ou Genomatix, cette délétion de 6 pbs a été identifiée comme un site MRE (Metal Response Element), site de liaison des facteurs MTF-1 (Metal-responsive Transcription Factor-1). Ces facteurs de transcription sont des régulateurs transcriptionnels ubiquitaires, impliqués dans la régulation du stress cellulaire, et dans le développement embryonnaire (Haroon *et al.*, 2004). Leurs cibles les mieux caractérisées sont les gènes codant pour les métallothionines,

impliquées dans l'homéostasie des métaux lourds, et le gène codant pour un transporteur d'ions zinc, ZnT1 (zinc transporter 1), qui exporte le zinc hors de la cellule (Haroon *et al.*, 2004; Majumder *et al.*, 2003; Wang, Y. *et al.*, 2004). Aucune information disponible ne permet d'établir un lien entre ces facteurs et la croissance musculaire. Les résultats du génotypage des 12 Bazadaises non plus, puisque ces deux polymorphismes existent indépendamment des notes phénotypiques attribuées aux animaux. Cependant, les transfections transitoires montrent une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur lorsque le site MRE est absent. On peut imaginer que les facteurs MTF-1, qui régulent le niveau d'expression de gènes cibles, occupent en permanence leurs sites de fixation sur l'ADN, afin de répondre très rapidement aux stress subis par les cellules et éviter l'apoptose. Ainsi, leur présence provoquerait un encombrement stérique et empêcherait la liaison à l'ADN d'autres facteurs activateurs, tels les facteurs Sp1. Une diminution de la quantité de ces facteurs liés à l'ADN aurait pour conséquence une baisse du niveau d'expression du gène *ACVR2B*, qui se traduirait par une diminution de la quantité de récepteurs ActRIIB présents à la surface des cellules musculaires squelettiques et donc, par une diminution de l'activité inhibitrice exercée par la myostatine.

La délétion du site ACACGC provoque aussi la disparition d'un dinucléotide CpG dans la région promotrice du gène. La substitution du nucléotide C en nucléotide T en position 1593 de la région 3'UTR, qui lui est associée, fait disparaître un deuxième dinucléotide CpG. Ces sites sont connus pour être des régions potentielles de méthylation impliquées dans la régulation de la transcription des promoteurs, et apparaissent préférentiellement au niveau des sites d'amorçage de la transcription des gènes (Hannenhalli and Levy, 2001). Le taux de méthylation des îlots CpG est lié au taux d'expression d'un gène. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par les tests d'activité du promoteur. La délétion d'un site potentiel de méthylation augmenterait la transcription du gène. Néanmoins, les résultats obtenus avec les constructions chimères montrent aussi l'importance du second SNP détecté dans la région 5'UTR, puisque l'expression n'est augmentée que lorsque la délétion est associée au nucléotide T. Ces deux sites spécifiques pourraient être impliqués simultanément dans la reconnaissance et l'association de protéines activatrices ou inhibitrices, nécessaires pour l'amorçage ou la régulation de la transcription. Ils pourraient, en effet, de par leur position éloignée, nécessiter le repliement de la séquence promotrice du gène *ACVR2B* dans une structure de type en épingle à cheveu, afin de permettre le positionnement correct de

protéines activatrices grâce à la reconnaissance de ces deux sites, et ainsi activer la transcription.

Nous avons également étudié le gène codant la follistatine bovine. La follistatine est une glycoprotéine sécrétée et circulante, qui neutralise l'activité d'autres protéines telles que les Activines, les BMPs et la myostatine, membres de la superfamille des TGF- β s. Elle est constituée de quatre domaines, un domaine N-terminal, et trois domaines follistatine (FS) successifs, caractérisés par un alignement parfait des 10 résidus Cystéine (Innis and Hyvonen, 2003). Sa liaison avec l'activine, *via* le domaine N-terminal, empêche cette dernière de se fixer sur son récepteur membranaire (Sidis *et al.*, 2001), et la présence d'un domaine héparane-sulfate dans le domaine FS-I, permet aux complexes d'interagir avec des protéoglycannes de surface, et de réguler l'internalisation et la dégradation de l'activine (Innis and Hyvonen, 2003). De façon surprenante, la présence du domaine C-terminal dans la structure protéique de la follistatine, réduit l'affinité de liaison à la surface des cellules, en masquant éventuellement le site héparane-sulfate. Les nombreuses Cystéines présentes dans chaque domaine, forment des ponts disulfures, permettant ainsi à chaque domaine FS, de former une unité de repliement autonome. Il semblerait que ces unités soient capables d'interagir avec des facteurs de croissance et d'autres ligands extracellulaires ou transmembranaires. Dans le cas du transport et de la régulation de la myostatine, les quatre domaines de la protéine sont nécessaires (Amthor *et al.*, 2004).

Nous avons confirmé l'existence des deux transcrits alternatifs dans différents tissus. Un transcrit court, constitué de six exons dans sa partie codante, qui donne naissance à la forme protéique longue de la follistatine, FS-315, la forme FS-303, majoritaire *in vivo*, étant issu du clivage protéolytique post-traductionnel de l'exon 6. Un transcrit long, dont la partie codante est plus courte du fait de la présence d'un codon stop prématuré situé au début de l'exon 6, et qui code pour la forme courte de la follistatine, FS-288. Ce transcrit diffère également du précédent par sa partie 3'UTR, beaucoup plus longue. De façon surprenante, ils n'ont pu être amplifiés simultanément en RT-PCR par le même couple d'oligonucléotides, alors qu'avant d'être maturé pour donner les deux formes alternatives des ARNm, les deux pré-ARNm devraient présenter la même structure nucléotidique. Cette hypothèse est fondée

sur l'observation des séquences nucléotidiques des deux transcrits chez l'humain et le porc présentes dans les banques de données. Cependant chez le bovin, les multiples tentatives pour obtenir la partie 3'UTR du transcrit long par RACE-PCR sont restées infructueuses. Ainsi sa partie 3' n'a jamais pu être identifiée et pourrait être différente de celle du transcrit court dans cette espèce.

Nous avons également constaté l'existence d'un autre site d'épissage alternatif situé au début de l'exon 5, pouvant être à l'origine de nouvelles formes de transcrits et donc de protéines supplémentaires. En effet, nous savons que le nombre de protéines effectives n'est pas limité à trois et qu'il dépend de l'état de glycosylation des différents sites présents dans la protéine. Ainsi, cette délétion qui provoque le changement de deux acides aminés, une Lys²⁴¹ et une Ala²⁴² en un résidu Thr²⁴¹, pourrait augmenter le nombre de formes protéiques actives. Ce phénomène, qui existe aussi chez la souris, l'homme et le porc, n'a jamais été étudié, et aucune information dans la littérature ne fait état de sa fonctionnalité. Ces deux acides aminés, Lys²⁴¹ et Ala²⁴², sont localisés entre les deux domaines FS-I et -II, et semblent être des éléments indispensables au repliement correct de la protéine. En effet, leur position, laisse penser qu'ils participent à l'établissement de la structure tridimensionnelle de la protéine mature en permettant le positionnement correct des domaines FS-II et -III. Le remplacement de ces deux acides aminés par un résidu unique pourrait ainsi diminuer la flexibilité de cette région charnière, et gêner la structure tertiaire de la protéine. Ses interactions avec d'autres protéines, comme la myostatine, pourraient ainsi être modifiées, voire inhibées. Il aurait été intéressant d'étudier l'existence ou l'expression de ces transcrits chez des animaux marqués par une hypertrophie musculaire. On sait que c'est la forme protéique FS-288 qui à l'activité inhibitrice la plus importante, mais il n'a jamais été décrit dans la littérature si l'absence de ces deux acides aminés lui confère le même pouvoir de neutralisation. Des études d'immunoprécipitation pour tenter d'isoler les complexes follistatine/myostatine dans le sérum de bovins « hypertrophiés », auraient pu révéler une forme protéique particulière de la protéine inhibitrice.

Un autre volet de notre étude sur le gène codant la follistatine, était de mettre en évidence des polymorphismes de séquence susceptibles de modifier l'activité de la protéine. Comme dans le cas du gène *ACVR2B*, aucune mutation qui aurait pu changer la séquence peptidique n'a été détectée. Deux clusters de SNPs ont néanmoins été observés dans les introns 4 et 5 parmi les 12 Bazadaises étudiées. Ils pourraient être impliqués là encore, dans

les processus d'excision des exons 5 et 6, et notamment dans l'épissage des 3 nucléotides décrits précédemment. Deux microsatellites à deux nucléotides répétés ont également été mis en évidence dans le gène codant la follistatine. Le microsatellite situé dans le promoteur putatif est une succession de deux nucléotides CA interrompus par des dinucléotides CT. Il est polymorphe. Neuf allèles ont été observés après le génotypage de 76 bovins de races différentes, correspondant à un nombre de répétition CA variant de 12 à 21. Un autre microsatellite se situe dans l'intron 1 et consiste en une succession de TG et TA. Il est beaucoup moins polymorphe et 5 allèles seulement ont été détectés chez les mêmes individus génotypés. Les séquences répétées à deux nucléotides sont très dispersées chez les mammifères et sont très polymorphes, c'est pourquoi elles sont fréquemment utilisées pour les études d'analyses génétiques et pour le développement des cartes de liaison génétique. Contrairement aux répétitions à trois nucléotides, elles ne se retrouvent jamais dans les régions codantes des gènes, mais sont localisées en dehors des gènes ou dans les introns (Akai *et al.*, 1999). Leur implication dans le niveau d'expression des gènes peut être différente. En effet, dans certains cas l'expression d'un gène est inversement corrélée à longueur d'un microsatellite. Ainsi, les études sur le gène codant le récepteur du facteur de croissance de l'épiderme (Gebhardt *et al.*, 1999), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), montrent que le nombre de répétitions des dinucléotides du microsatellite présent dans l'intron 1, a un effet inhibiteur sur l'expression du gène. Dans un autre cas inverse, la longueur des répétitions CA du microsatellite présent dans le promoteur du gène codant la protéine MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9) (Huang *et al.*, 2003), est associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur. Dans ce cas, le nombre de CA affecterait la liaison des protéines nucléaires sur la région promotrice du gène, ce qui modifierait l'activation du promoteur. Plusieurs hypothèses sur l'implication de ces séquences répétées dans la modulation de la transcription sont évoquées. La longueur des répétitions augmenterait la flexibilité des séquences d'ADN, et certaines études ont montré que les courbures des séquences d'ADN sont importantes dans les processus de transcription, de réplication, ou encore qu'elles représentent des sites spécifiques de recombinaison (Gebhardt *et al.*, 1999). Aussi, les microsatellites à dinucléotides ont un fort potentiel pour former des structures conformationnelles dites conformation en Z, connues pour réguler la transcription des gènes.

Dans notre étude, deux microsatellites à dinucléotides ont été localisés dans le promoteur putatif et dans l'intron 1 du gène codant la follistatine bovine. Leur implication éventuelle dans la régulation de la transcription de ce gène n'a jamais été étudiée. Plusieurs

allèles ont été détectés parmi les races étudiées et il serait intéressant de regarder si différentes combinaisons alléliques de ces deux microsatellites pourraient influencer l'activité transcriptionnelle du gène *FST*, comme dans le cas du gène humain *COL1 A2* (type I collagen $\alpha 2$), dont l'expression est modulée par deux microsatellites, localisés à des endroits identiques dans la séquence (Akai *et al.*, 1999). De plus, une étude réalisée sur le récepteur de l'hormone de croissance chez le bovin (Hale *et al.*, 2000), a mis en évidence un lien étroit, entre le nombre de répétitions d'un microsatellite à deux nucléotides TG situé dans le promoteur, et les caractéristiques phénotypiques de croissance et de la carcasse des animaux. Cette étude a révélé que l'allèle le plus court, majoritairement présent dans la race Angus, était associé à une diminution de ces traits phénotypiques, et que, par conséquent, la longueur des microsatellites, pouvait être une source importante de variation des traits quantitatifs chez ces animaux domestiques. Il faut cependant rester prudent concernant l'influence directe de ce microsatellite sur la transcription, car d'autres expériences réalisées avec les mêmes séquences ovines, ne montrent aucun lien significatif entre le nombre de répétitions et le taux de transcription de ce gène. Chez le bovin, l'allèle le plus court pourrait être en déséquilibre de liaison avec d'autres allèles proximaux, directement responsables de cette diminution de la croissance. Il aurait été intéressant d'évaluer l'influence des microsatellites détectés dans le gène *FST* sur le taux de transcription du gène, en réalisant le même type de constructions que celles réalisées avec le gène *ACVR2B*. Une augmentation du niveau de transcription du gène *FST* suivie d'une augmentation du taux de protéines pourraient participer au processus d'hypertrophie musculaire. Il y aurait davantage de complexes follistatine/myostatine formés, et par conséquent moins de myostatine sous forme libre et active, capable de se fixer sur le récepteur membranaire et de réguler la masse musculaire. La forme FS-303, majoritaire *in vivo*, interagit avec les protéoglycannes de surface situés à proximité des récepteurs pour réguler la fixation des ligands sur ces derniers. Une augmentation de la quantité de cette protéine régulatrice provoquerait un déséquilibre entre les taux circulants et les complexes dirigés vers les cellules lysosomales afin d'être dégradé. Une augmentation de la quantité de myostatine internalisée et dégradée irait vers une augmentation de la croissance musculaire. Il a été montré récemment (Iezzi *et al.*, 2004) que la follistatine est un médiateur essentiel des effets exercés par les inhibiteurs des déacétylases dans le recrutement et la fusion des myoblastes en myotubes. La follistatine, induite par ces inhibiteurs, pourrait ainsi favoriser le recrutement des cellules satellites et l'augmentation de la taille des cellules musculaires, en inhibant l'activité de la myostatine.

Les données apportées par nos travaux sur la structure et l'expression des gènes bovins *ACVR2B* et *FST*, ouvrent de nouvelles perspectives d'étude sur l'implication éventuelle de ces deux gènes dans la régulation de la masse musculaire. Les polymorphismes mis en évidence dans les régions promotrices, susceptibles d'être impliqués et de participer à la régulation de leur expression, suscitent un intérêt particulier et ouvrent de nouvelles pistes pour approfondir les connaissances actuelles sur la régulation de la transcription de ces deux gènes. Même si l'ensemble des résultats présentés ici n'établit pas un lien direct avec l'hypertrophie musculaire, de plus amples expérimentations mériteraient d'être poursuivies.

Des protocoles d'étude pourraient être mis en place afin de réaliser le génotypage et le phénotypage d'un grand nombre de bovins de races différentes, provenant également de pays géographiquement éloignés, avec des modes d'élevage et des critères de sélection différents. Des croisements génétiques, associés à des mesures phénotypiques précises, permettraient d'observer, d'une part, la ségrégation des différents allèles des gènes *ACVR2B* et *FST* détectés, et leur association éventuelle avec un niveau différentiel de croissance musculaire. D'autre part, ces expérimentations permettraient de mettre en évidence des QTLs d'intérêts, associés ou non à ces deux gènes, et impliqués dans la régulation du développement musculaire.

A ces protocoles pourraient être associées des études quantitatives sur l'expression des gènes *ACVR2B* et *FST*, réalisées à partir d'échantillons biologiques d'animaux phénotypiquement caractérisés, porteurs et non porteurs de mutations dans le gène codant la myostatine. Les premiers résultats obtenus *in vitro* sur l'activité transcriptionnelle du promoteur *ACVR2B*, indiquent une augmentation du taux de transcription, liée à la présence des deux polymorphismes détectés dans cette partie du gène. Il serait intéressant de quantifier l'expression des transcrits dans différents tissus musculaires en fonction des différents allèles du promoteur exprimés. Cette technique pourrait également permettre d'étudier l'influence des microsatellites, et particulièrement l'influence de la longueur des répétitions du microsatellite situé dans le promoteur, sur le niveau d'expression du gène *FST*. De manière plus approfondie, ces travaux pourraient être réalisés à partir de tissus musculaires fœtaux et adultes, afin de comparer l'expression tissulaire de ces gènes à des périodes bien distinctes du développement musculaire.

Une étude plus fine sur l'existence de transcrits différentiels, générés par les SNPs présents dans les introns et les promoteurs, et indétectables par des techniques classiques,

pourrait être réalisée par la mise au point de techniques de protection des ARN (RNA protection assay), qui permet également de quantifier les ARNm faiblement exprimés.

La fonctionnalité du site MRE, dont une partie disparaît chez les animaux possédant l'allèle (1076delACACGC) du gène *ACVR2B*, pourrait être étudiée par la technique de retard sur gel, qui permet de détecter les interactions des sites de transcription avec des protéines régulatrices spécifiques. Les deux allèles du gène observés chez les animaux génotypés pour ce polymorphisme, et les constructions chimères déjà utilisées pour les tests d'activité transcriptionnelle, pourraient permettre de déterminer les capacités de liaison de ces différentes séquences, et surtout d'identifier des protéines nucléaires susceptibles de se fixer.

Enfin, il serait intéressant d'étudier *in vitro* l'influence des polymorphismes du promoteur *ACVR2B*, dans un système cellulaire de type musculaire, telles que les cellules murines C2C12, plus proche du phénotype des cellules musculaires bovines. Ces études permettraient de caractériser plus précisément l'influence spatio-temporelle de ces mutations dans les processus de croissance, de prolifération et de différenciation des cellules musculaires.

Matériels &

Méthodes

Race	N° ADN	N° National	Sexe	Age (mois)	Q204X	Nt821	Nt419	E226X	C313Y	F_94L	N.P.
Bazadaise	26465	4098013304	F	12	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	11,4
Bazadaise	26392	6502067262	M	.	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	17,5
Bazadaise	26398	6502148298	M	.	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	17,9
Bazadaise	30427	4003603952	M	2,6	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	18,2
Bazadaise	30441	3330003217	M	3,7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	18,2
Bazadaise	30533	3299011930	M	9,7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	12,5
Bazadaise	25954	3398016501	F	10,1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	2,9
Bazadaise	25955	3398016492	F	10,2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	3,2
Bazadaise	26394	6502067265	F	.	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	5,7
Bazadaise	25958	4098013293	M	6,7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	3,9
Bazadaise	26094	3398016797	M	7,3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	4,3
Bazadaise	15653	3297049805	M	13,0	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	0,7
Charolaise	30880	6950047936	M	16,5	mh/mh	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	20
Charolaise	26295	7198107610	M	14,2	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	2,1
Gasconne	26708	999128163	M	1,5	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/mh	+/+	16,1
Gasconne	26635	3150259539	M	1,9	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	0
Parthenaise	25182	8596063536	M	8,1	+/+	mh/mh	+/+	+/+	+/+	+/+	13,2
Parthenaise	29935	4974379784	M	2,7	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/mh	0
Parthenaise	26425	7998002781	F	37,2	mh/+	mh/+	+/+	+/+	+/+	+/+	15,7
Maine-Anjou	29578	5342370281	M	9,8	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	0
Maine-Anjou	25527	4998013558	F	2,5	+/+	+/+	+/+	mh/mh	+/+	+/+	16,1
Maine-Anjou	25978	4977361183	F	9,7	+/+	+/+	mh/+	mh/+	+/+	+/+	17,5
Limousine	29155	8170157002	M	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/mh	.
Limousine	29156	8170157003	M	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/mh	.
Limousine	29157	8170155014	M	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	.
Limousine	Cesar	1925501C08	M	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/mh	.
Limousine	Horten	8772014394	M	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/mh	.
Blonde Aqu.	29133	4721302A03	M	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	.
Blonde Aqu.	29135	2427406C02	M	-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	.
INRA95	35341	8130139943	M	4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/+	10,3
INRA95	50368	8130391676	M	4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	11,5
INRA95	15709	8120011275	M	4	mh/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/+	12
INRA95	25572	8130298080	M	4	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	mh/+	11,8

Tableau 13: Liste des ADNg bovins typés pour le gène codant la myostatine (GDF-8).

Trente trois animaux de races Bazadaise, Charolaise, Gasconne, Maine Anjou, Limousine, Blonde d'Aquitaine, et des animaux issus du programme INRA95, ont été génotypés pour les mutations fonctionnelles connues du gène codant la myostatine, et phénotypés pour leurs caractéristiques de développement musculaire.

N.P. : Note Phénotypique ; + : allèles sauvage ; mh (muscular hypertrophy) : allèle muté.

L'ADNg des 12 individus de races Bazadaise, dont les caractéristiques génétiques et phénotypiques, sont surlignés en gris, ont servis de matrices pour l'identification des SNPs dans la séquence des gènes bovins *ACVR2B* et *FST*. L'ADNg des 33 individus a été utilisé pour le génotypage des 2 microsatellites, détectés dans le *FST* bovin.

Matériel biologique.

I.1 Bactéries.

Les souches bactériennes sont dérivées d'*Escherichia coli* K12. Elles sont utilisées principalement pour la répllication des plasmides. Les souches utilisées dans cette étude sont : DH5 α et JM109 pour le clonage des fragments d'ADN, et BL21(DE3) pour l'expression de la myostatine recombinante.

I.2 Vecteurs.

Différents vecteurs, répllicatifs chez *Escherichia coli*, ont été utilisés au cours de ce travail. Leurs caractéristiques sont présentées ci-dessous :

Nom et référence	Marqueur de sélection	Taille (pb)	Promoteur
pGEM T Easy® (Promega)	AmpR	3018	<i>lacZ</i>
pUC18	chloramphénicolR	2686	<i>lacZ</i>
pEGFP-1(Clontech)	KanaR	4200	-

I.3 ADN génomique.

Les échantillons d'ADNg utilisés comme matrice pour toutes les manipulations effectuées au cours de ce travail viennent de Labogena et nous ont été gracieusement fournis par François Menissier. Ce sont des ADNg bovins de différentes races qui ont été génotypés pour les cinq mutations fonctionnelles (Q204X, Nt821, Nt419, E226X, C313Y) du gène codant la myostatine (GDF-8), connues pour être responsable de l'apparition du phénotype « hypermusclé », et pour une mutation conservative, F_94L (Tableau 13), non fonctionnelle à l'état homozygote.

Au cours de nos travaux nous avons principalement utilisé l'ADNg des individus de races Bazadaise, car ils étaient en plus grand nombre, et par conséquent ils représentaient un éventail plus large des caractéristiques du développement musculaire.



Figure 39 : Photos de bovins de la race Bazadaise.

Cette race est originaire des coteaux du BAZADAIS (Figure 39) et du massif landais. Le Herd Book BAZADAIS a été créé en 1896. Les effectifs, autrefois nombreux, ont fortement régressé et un plan de relance a été mis en place en 1970 alors que l'on ne recensait plus que 700 animaux inscrits. Aujourd'hui, la race BAZADAISE compte 4 500 animaux localisés dans le grand Sud-Ouest, de la Gironde au massif Pyrénéen.

Ancienne race de travail, la BAZADAISE est à présent une race allaitante spécialisée dans la production de viande. En race pure, sa notoriété s'est faite par la production de veaux de boucherie. La finesse du squelette et la bonne conformation des produits procurent des carcasses très prisées par la boucherie traditionnelle. Par ailleurs, la présence de persillé et le grain très fin de sa viande sont les garanties d'une tendreté et d'une saveur reconnues par tous les professionnels. En croisement, des naissances faciles et l'amélioration de la conformation des produits justifient une utilisation importante des semences et taureaux sur des troupeaux laitiers.

I.4 Tissus

Pour l'extraction d'ARN totaux, des fragments de tissus bovins ont été prélevés, découpés et conservés dans l'azote liquide aussitôt après abattage des animaux du centre d'élevage de l'INRA de Theix, afin de conserver intacte leur structure. Ces échantillons proviennent de différents organes tels que le cerveau, le cœur, le foie, le pancréas, les poumons, la rate, les reins et les testicules, et de différents tissus musculaires squelettiques, tels que le diaphragme, l'onglet, et les muscles *rectus abdominis*, *longissimus dorsi* et *semi tendinosus*. Ils sont aliquotés et conservés à -80°C.

Méthodes microbiologiques et génétiques.

II.1 Conditions de culture des bactéries.

Les souches d'*E.coli* sont conservées à -80°C dans du glycérol (30% (v/v) final). Elles sont cultivées sur milieu liquide LB à 37°C , sous agitation à 250 rpm, en Erlenmeyer ou, pour de petits volumes, dans des tubes à essais.

Milieu Luria-Bertani (LB) :

Tryptone (Difco)	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau distillée q.s.p	1l

Le pH est ajusté à 7,5 avec de la soude 0,5 N.

Stérilisation 20 min à 120°C .

Milieu SOC (100 ml):

Tryptone (Difco)	2 g
Extrait de levure	0,5 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,75 g
MgCl ₂	0,04 g
MgSO ₄	0,05 g
Glucose	0,36 g

Stérilisation 30 min à 105°C .

Les milieux solides contiennent 1,8% (p/v) d'agar (Difco).

L'ampicilline est utilisée à 100 $\mu\text{g/ml}$ à partir d'une solution mère à 10 mg/ml et conservée à -20°C . Cet antibiotique permet la sélection des plasmides portant le gène conférant la résistance à l'ampicilline codant la β -lactamase.

Le chloramphénicol est utilisé à une concentration de 12,5 $\mu\text{g/ml}$. La solution mère (12,5 mg/ml) est préparée dans de l'éthanol et conservée à -20°C .

Pour le test d' α -complémentation du gène *lacZ* chez *E.coli*, le X-Gal est utilisé à 40 $\mu\text{g/ml}$ et l'IPTG (0,1 M) à 40 μM .

*II.2 Transformation par choc thermique de *Escherichia coli**

Les bactéries dites compétentes ont subi un certain nombre de traitements chimiques qui les rendent particulièrement aptes à internaliser un acide nucléique étranger. Une suspension bactérienne est décongelée et incubée dans la glace 30 min en présence de 10 ng d'un mélange de ligature. Le choc thermique s'effectue à 42°C pendant 45 s ou à 37°C pendant 20 s selon si l'on utilise une souche bactérienne JM109 ou DH5 α respectivement. Puis les bactéries sont de nouveau placées dans la glace 3 min. Du milieu LB (250 μ L) est ajouté à la suspension, et le mélange est incubé 1 h à 37°C sous agitation (250 rpm) de façon à permettre l'expression du gène de résistance à l'antibiotique présent dans le vecteur. La totalité de la suspension est alors étalée sur un milieu de culture LB supplémenté en antibiotique adéquat (Ampicilline 100 μ g/mL ou Kanamycine 34 μ g/mL), et incubée à 37°C pendant 12 h.

Méthodes de biologie moléculaire.

III.1 Préparation d'ADN.

III.1.1 Extraction d'ADN à partir de tissus.

L'échantillon, congelé dans l'azote, est découpé dans une boîte de pétri et replit dans du tampon à l'urée (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, Urée 8 M) à raison de 6 ml pour 1 g. Les protéines sont dégradées par ajout d'une solution de protéinase K à 150 µg/ml final. Cette préparation est incubée à 56°C avec agitation pendant 12 à 18 h. On réalise ensuite une extraction au phénol/chloroforme (v/v). Les tubes sont agités manuellement et centrifugés à vitesse maximale pendant 10 min. La phase aqueuse est récupérée et additionnée d'un volume de chloroforme. Cette solution est également agitée à la main et centrifugée à vitesse maximale pendant 10 min. A nouveau la phase aqueuse est récupérée, et les acides nucléiques sont précipités par addition d'une solution d'acétate de sodium 3M pH 5,2 (1 volume pour 10 volumes de solution) et de 2 volumes d'éthanol 95%. Le mélange est placé 15 min à -80°C ou 2 h à -20°C puis centrifugé (12000xg à 4°C, 30 min). Le culot est lavé à l'éthanol 75% (v/v) afin d'éliminer les résidus d'acétate de sodium, puis séché sous vide. L'ADN génomique est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur et dissous dans le tampon TE additionné de RnaseA (20 µg/ml). Sa concentration est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm. La solution ainsi obtenue est conservée à 4°C.

*III.1.2 Mini-préparation d'ADN plasmidique de *Escherichia coli*.*

L'ADN destiné au séquençage est isolé avec le kit « High Pure Plasmid Isolation » (Roche), dont le principe est basé sur une lyse alcaline suivie d'une interaction entre l'ADN plasmidique et une résine échangeuse d'anions. Une culture d'une nuit de 3 ml est centrifugée à 4000xg 5 min et le culot est repris dans 250 µl de tampon 1 (Tris-HCl pH 8,0 50 mM, EDTA 10 mM, RNase A 0,1 mg/ml. Un volume de 250 µl de tampon de lyse (NaOH 0,2 M, SDS 1%) est ajouté, mélangé par retournements successifs et incubé 5 min à température ambiante. 350 µl de tampon de liaison (hydrochloride de guanidine 4 M, acétate de potassium pH 4,2 0,5M) maintenu à 4°C sont ensuite ajoutés. Le mélange est incubé 5 min dans la glace

puis centrifugé 10 min à 13000xg. Le surnageant récupéré est déposé délicatement sur une colonne « High Pure » et centrifugé 1 min à 13000xg. La colonne est successivement lavée par 500 µl de tampon de lavage I (Tris-HCl pH 6,6 20 mM, hydrochloride de guanidine 5 M, éthanol 37,5%) et 750 µl de tampon de lavage II (Tris-HCl pH 7,2 2 mM, NaCl 20 mM, éthanol 80%), et centrifugé 30 sec à 1 min à 13000xg. L'ADN est élué par 50 µl de tampon d'éluion (Tris-HCl pH 8,5 10 mM, EDTA 1 mM) et centrifugation de la colonne 1 min à 13000xg. L'ADN est conservé à -20°C.

III.1.3 Midi-préparation d'ADN plasmidique de Escherichia coli.

Les midi-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées avec le kit « HiSpeed™ Plasmid Purification » (QIAGEN), dont le principe est basé sur une lyse alcaline suivie d'une interaction entre l'ADN plasmidique et une résine échangeuse d'anions. Un clone est mis en préculture pendant 8 h à 37°C avec agitation dans 5 ml de LB additionné de 5 µl kanamycine à 15 mg/ml. Cette préculture sert ensuite à ensemercer dans 50 ml de LB, car il s'agit d'un plasmide « High-copy », pendant une nuit à 37°C avec agitation. Ces 50 ml de culture sont centrifugés à 6000 x g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est repris dans 6 ml de tampon de resuspension (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 10 mM EDTA, RNaseA (100 µg/ml)). Les cellules sont lysées après l'addition de 6 ml de tampon de lyse (200 mM NaOH, 1% SDS). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 6 ml de tampon de neutralisation (acétate de potassium 3,0 M, pH 5,5) sont ajoutés et mélangés par retournement jusqu'à l'apparition d'un gros précipité. Le lysat est alors transféré dans la cartouche « QIAfilter Cartridge » et laissé 10 min en incubation afin que le précipité remonte à la surface. Après avoir équilibré une colonne « HiSpeed Midi Tip » avec 4 ml de tampon QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol 15% (v/v), TritonX-100 0,15% (v/v)), la cartouche est placée à l'intérieur et le piston est inséré jusqu'à ce que tout le lysat soit passé (environ 15 ml). Ensuite ce lysat est lavé avec 20 ml de tampon QC (NaCl 1,0 M, MOPS 50 mM pH 7, isopropanol 15% (v/v)), l'ADN est élué avec 5 ml de tampon d'éluion (NaCl 1,25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8,5, isopropanol 15% (v/v)) et précipité pendant 5 min à température ambiante avec 3,5 ml d'isopropanol. L'ADN est enfin récupéré par transfert sur un filtre « QIAprecipitator Midi Module » placé au bout d'une seringue et ajout d'1 ml de tampon d'éluion (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) filtré deux fois. La concentration de l'ADN récupéré est mesurée par dosage de l'absorbance à 260 nm.

III.1.4 Midi-préparation d'ADN de BAC.

Les midi-préparations d'ADN de BAC sont réalisées à partir d'un protocole issu de « Molecular Cloning » et modifié par Jin-Tae Jeon. Un clone de BAC est mis en préculture pendant 8 h à 37°C avec agitation dans 5 ml de LB additionné de 5 µl de chloramphénicol (solution mère à 12,5 mg/µl). Un ml de cette préculture est ensuiteensemencé dans 50 ml de LB additionné de 500 µl de chloramphénicol (solution mère à 12,5 mg/µl) pendant une nuit à 37°C avec agitation. Ces 50 ml de culture sont centrifugés à 5000xg pendant 30 min. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien est repris dans 2 ml de solution I (50 mM de glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 8). Les cellules sont lysées après l'addition de 4 ml de solution II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Après 2 min d'incubation à température ambiante, 3 ml de solution III (acétate de potassium 5 M, acide acétique glaciale) sont ajoutés et mélangés par retournement. Les tubes sont incubés 30 min dans la glace et centrifugés 20 min à 5000 x g à 4°C. Le surnageant est prélevé et filtré délicatement avec de la gaze stérile, et peut-être conservé à -20°C pendant plusieurs mois. 750 µl sont utilisés pour une réaction de séquençage. A ce volume sont ajoutés 450 µl d'isopropanol et le tube est agité par retournements délicats et centrifugé pendant 15 min à 15000xg. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol glacé à 70% avant d'être centrifugé pendant 5 min. L'excédent d'éthanol est oté et le culot est séché avant d'être repris dans 40 µl de tampon TE contenant de la RNase A (20 µg/ml). Cette solution est ensuite incubé à 37°C pendant 10 min.

III.1.5 Purification de l'ADN de BAC pour séquençage.

Après digestion sur la nuit de l'ADN de BAC par l'enzyme de restriction choisie, l'ADN est purifié avec le kit QIAEX II (QIAGEN). 3 volumes de QX1 et 2 volumes d'H₂O sont ajoutés aux 200 µl réactionnels avant d'ajouter 30 µl de QIAEX II et d'incuber 30 min à température ambiante. Des agitations délicates de la solution sont effectuées toutes les 2 min pour resuspendre les billes de silice qui fixent l'ADN contenues dans la solution de QIAEX II. L'échantillon est centrifugé 1 min à 13000xg et le surnageant est aspiré. Le culot contenant l'ADN fixé aux billes, est lavé deux fois avec 500 µl de tampon PE puis séché à l'air libre pendant 20 à 30 min jusqu'à ce qu'il devienne blanc. Il est ensuite resuspendu dans 200 µl

d'H₂O et incubé à 50°C pendant 5 min afin de dissocier l'ADN des billes. Après une rapide centrifugation le surnageant est prélevé très délicatement et transféré dans un tube eppendorf propre. Ce surnageant est à nouveau centrifugé pour s'assurer qu'aucune bille n'a été prélevée la première fois. L'ADN est précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes d'éthanol 95% pendant 30 min à -20°C, puis centrifugé à 4°C à 13000xg pendant 20 min. Le culot obtenu est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70%, centrifugé 10 min puis séché et repris dans 10 µl d' H₂O stérile.

III.2 Les enzymes de modification de l'ADN.

III.2.1 Les endonucléases de restriction.

Les endonucléases de restriction reconnaissent dans l'ADN des séquences spécifiques, le plus souvent palindromiques. Après coupure, les fragments d'ADN présentent des extrémités franches ou cohésives. Dans ce dernier cas, le fragment d'ADN bicaténaire est prolongé aux extrémités 3' ou 5' par une courte séquence d'ADN simple brin. Elles sont utilisées dans les conditions recommandées par les fournisseurs. Généralement, la réaction s'effectue dans le milieu d'incubation suivant :

ADN	1 à 2 µg
Tampon 10X	2 µl
Endonucléase	2 à 10 unités
H ₂ O mQ q.s.p.	20 µl

S'il s'agit de la digestion d'un BAC, la réaction est la suivante :

BACs	80 µl (2 x 40 µl obtenus en midi-préparation)
Tampon 10X	20 µl
Enzyme	4 µl (40 unités)
RNase A (10 mg/ml)	2 µl
H ₂ O mQ q.s.p	200 µl

Le mélange réactionnel est incubé 2 h à la température optimale d'activité de l'enzyme ou toute la nuit s'il s'agit d'un BAC. La réaction est arrêtée par chauffage de l'échantillon 5 min à 65°C. La RNase est ajoutée pour prévenir les contaminations par de l'ARN.

III.2.2 La phosphatase alcaline.

La phosphatase alcaline est utilisée pour enlever le groupement 5' phosphate des molécules linéaires d'ADN. Le clivage d'un plasmide avec une seule enzyme de restriction produit un fragment d'ADN linéaire avec des extrémités franches ou cohésives. Ces extrémités laissent toute possibilité au fragment de se relier sur lui-même lors d'une ligature. La phosphorylation, qui enlève les groupements 5' phosphate nécessaires à la liaison avec les extrémités 3' hydroxyles, empêche le vecteur de se ligaturer sur lui-même.

L'enzyme utilisée est la phosphatase alcaline de crevette, SAP (Shrimp Alcaline Phosphatase) (Promega).

Le milieu réactionnel est le suivant :

ADN	25 ng
Tampon 10X	2 µl
Enzyme SAP	1 unité
H2O mQ q.s.p	20 µl
Tampon 10X :	
Tris-HCl (pH 9)	0,5 M
MgCl ₂	10 mM

Le milieu réactionnel est incubé 30 à 40 min à 37°C. L'enzyme est inactivée en chauffant 15 min à 65°C. Un aliquot peut-être contrôlé en gel d'agarose (chapitre III.1.1.).

III.2.3 Les Taq DNA polymérase.

Les polymérase thermostables sont utilisées lors de l'amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), mises au point par Saiki et coll. (1988). Cette technique permet d'amplifier sélectivement, *in vitro*, un fragment d'ADN à partir de deux oligonucléotides correspondants aux extrémités connues du fragment à amplifier. Les ADN polymérase de *Thermus aquaticus*, utilisées couramment au cours de ce travail, sont commercialisées par INTERCHIM et ABgène.

III.3 Analyse de l'ADN.

III.3.1 Migration horizontale en gel d'agarose.

III.3.1.1 Gels analytiques.

Les fragments d'ADN peuvent être séparés par électrophorèse en gel d'agarose en fonction de leur taille. La concentration en agarose varie en fonction de la taille des fragments que l'on souhaite séparer. Des fragments d'ADN linéaires de 10 à 1 Kb (gel à 0,8% (p/v)) ou de 3 à 0,1 Kb (gel à 2% (p/v)) peuvent ainsi être séparés. L'agarose mélangé avec du tampon TAE (1X) (Tris-acétate pH 8,0 40 mM, EDTA 1 mM) ou TBE (1X) (Tris-borate pH 8,0 89 mM, EDTA 2 mM) est dissout par chauffage. Avant d'être coulé, du Bromure d'Ethidium (BET) à 0,5 µg/ml final, est ajouté pour permettre la visualisation ultérieure des fragments d'ADN, en éclairant le gel aux UV de 254 à 300 nm. Le tampon de charge est ajouté aux échantillons pour faciliter leur dépôt dans le gel et pour permettre de suivre la migration.

Tampon de charge (5X) :

Glycérol	30% (v/v)
Bleu de bromophénol	0,25% (p/v)
Xylène cyanol	0,25% (p/v)

Le gel est immergé dans du tampon de migration TAE ou TBE (1X), la migration s'effectue de la cathode vers l'anode sous une tension de 2 à 10 V/cm. Un marqueur de poids moléculaire (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) est déposé en regard des échantillons afin d'apprécier la taille de ces derniers.

III.3.1.2 Gels préparatifs.

Ces gels sont utilisés afin d'extraire de l'agarose un fragment d'ADN après séparation électrophorétique. Ce gel identique au précédent, demande cependant quelques précautions particulières :

- la propreté du matériel électrophorétique pour éviter toute contamination.
- une exposition limitée en temps aux UV.

Après la migration, la bande d'agarose contenant le fragment d'ADN d'intérêt est découpée à l'aide d'une lame de scalpel stérile.

III.3.1.2.1 Purification des fragments d'ADN.

Le kit « QIAquick Gel Extraction » (QIAGEN) permet de purifier des fragments d'ADN à partir d'une bande d'agarose. La bande d'agarose (400 mg au maximum) contenant l'ADN est dissoute à 50°C pendant 10 min dans un tube Eppendorf contenant 3 volumes de tampon QG pour un volume de gel (100 mg \cong 100 μ l). Si le gel d'agarose a une concentration supérieure à 2%, il faut ajouter 6 volumes de tampon QG. Quand l'agarose est complètement dissout on ajoute un volume d'isopropanol, et on agite le mélange que l'on dépose sur une colonne Qiagen qui est centrifugée pendant 1 min à 10000 x g. Ainsi l'ADN est absorbé sur la membrane de silice de la colonne, et les contaminants passent au travers. 500 μ l de tampon QG sont ajoutés à nouveau et la colonne est centrifugée pendant 1 min à 10000 x g afin d'oter toute trace d'agarose. L'ADN est ensuite lavé avec 750 μ l de tampon PE qui sont ajoutés dans la colonne, laissés à température ambiante pendant 5 min, et centrifugé deux fois à 10000 x g. La colonne est alors placée dans un nouveau tube. 30 μ l d'eau ou de tampon EB sont ajoutés et laissés 5 min à température ambiante pour resuspendre l'ADN. La colonne est ensuite centrifugée pendant 1 min à 10000 x g afin d'éluer totalement l'ADN.

III.3.2 Analyse informatique de l'ADN.

L'alignement des séquences, la recherche des sites de coupures par les endonucléases de restriction, la recherche de cadres ouverts de lecture ainsi que la traduction en acides aminés des fragments d'ADN ont été effectués par les logiciels GeneJockey et DNA Strider.

La comparaison avec les banques de données, GenBank, EMBL, Swiss-prot a été réalisée avec le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) fonctionnant sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

Les alignements multiples de séquences nucléiques et protéiques ont été effectués avec le programme CLUSTALW disponible sur le site www.infobiogen.fr/services/analyseseq/cgi-bin/clustalw_in.pl.

Gènes	Amorces		Séquences	Positions	n°d'accession
<i>ACVR2B</i>	F1	Exon 1	5'-GAACATGACGGCGCCTGGGC-3'	1654/1674	AY775793
	R1		5'-CGGCGCACAGCGATCCCCAAA-3'	1709/1688	
	R9		5'-CCGCCAGGGCGCCGTCATGTTC-3'	1654/1676	
	F2	Exon 2	5'-GGAGTGCATCTACTACAACGCC-3'	29/50	AY775794
	R2		5'-AGTTGAAGTCGTCCAGCCAGC-3'	178/198	
	F3	Exon 5	5'-TGAAGCCTCTGCAACTGCTGG-3'	987/1008	
	R3		5'-CTGGAGTGGGAAGATCTTGACAG-3'	1071/1093	
	F4	Exon 7	5'-TCACGGATTACCTCAAGGGG-3'	2077/2096	
	R4		5'-GGGCAATAGATGGCTTGTGGC-3'	2194/2214	
	F5	Exon 8	5'-GAGTGACCTCACTGCTGTGC-3'	3820/3839	
	R5		5'-CCTGGCTCAAACCGAACAGCC-3'	3856/3876	
	F6	Exon 9	5'-CACGCGGCGGTACATGGCC-3'	4560/4579	
	R6		5'-GGCAGCTTTGCAGCGGGACA-3'	4670/4689	
	F7	Exon 10	5'-AGAAGATGCGGCCCGCCATCAAG-3'	4886/4908	
	R7		5'-CCAGTGATCCTTGATGGCGGG-3'	4897/4917	
	R8	3'UTR	5'-CTGAGTCTGGAGATCCACTCGTGTG-3'	6464/6488	
	F8	5'UTR	5'-AGCGGGAAGGAAAGCGCAGC-3'	1554/1573	AY775793
	F9 (3)		5'-CCGTTTCATGGCCCTCCGGAC-3'	1307/1327	
	F11 (2)		5'-GCGCGATGCCTGAGTCGGGCGC-3'	1365/1386	
	F12 (1)		5'-GTCGTTCTCAGAGCCCGGGC-3'	1425/1445	
F10	5'-ACGACGTAAGAGACCATTGTTCAT-3'		743/766		
R10	5'-TAGCCAGCACAGTGAGCAGG-3'		749/771		
<i>FST</i>	1F	Exon 1	5'-CGTCCTAGGCACCAGCCCGG-3'	1434/1453	AY775795
	2F	Exon 2	5'-CGCCAAGCAAAGAACGGCCGC-3'	3508/3528	
	2R		5'-GCGCCCCCGTTGAAAATCATCC-3'	3638/3659	
	3F	Exon 3	5'-TGAGAACGTGGACTGTGGCC-3'	4127/4146	
	3R		5'-TGCCCTGGTACTGGACTTCG-3'	4310/4329	
	4F	Exon 4	5'-GACTTGTAACAGAAATTTGCCAG-3'	4733/4755	
	4R		5'-TAGATCTGCCCAGTAGGCAGG-3'	4834/4854	
	5F	Exon 5	5'-CGATATCCAGTGCCTGGTGG-3'	5579/5599	
	5R		5'-CTTCACTTCCAGCAGCACGC-3'	7755/7774	
	6F	intron 5	5'-TGTCATCACACATAGGCTGCTGC-3'	6160/6182	
	6R		5'-CAACATTGAACATTGGTGGAGG-3'	6310/6339	
	7F	5'UTR/ microsatellite	5'-GGCGTTGCGAAGACCAACTCCCGC-3'	709/732	
	7R		5'-AAACATTATCTATGAAGTCAAAAAGTGCAG-3'	1001/1026	
	8F	intron 1/ microsatellite	5'-TAATAGCAGCTTGCAGTCCAATTA-3'	2291/3314	
	8R		5'-CGCCGAGTTCTTATTTGCGTAGGAGC-3'	2556/2579	
	11R	3'UTR	5'-AAGTTCCAAGTCTGCCTCAAGAAA-3'	6632/6653	
	9F(4)	5'UTR	5'-CCCTCCTGCCCTTTGATTTCCGG-3'	1031/1053	
	10F(3)		5'-CCCCAAGGAACCGCGCACACC-3'	1147/1157	
	11F(2)		5'-CGTGGAGACCCCGTCTAGATTA-3'	1215/1238	
	12F(1)		5'-GGGCTACGCCGGGATAGCTGC-3'	1302/1322	
9R	5'-CCATGAACTGGCAGAGAAGCAGCA-3'		1471/1494		
10R	5'-GGCAAAGCCCGCGGGCTGGT-3'		1444/1464		
	AP1		5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'		Adaptateurs GenomeWalker
	AP2		5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'		

Tableau 14: Séquences et positions des oligonucléotides utilisés.

Les oligonucléotides F12 (1), F11 (2) et F9 (3) ont permis l'obtention du nucléotide +1 putatif du gène *ACVR2B*. Les oligonucléotides 12F (1), 11F (2) et 10F (3) et 9F(4) ont permis l'obtention du nucléotide +1 putatif du gène *FST*.

Les oligonucléotides AP1 et AP2 Sont les adaptateurs du kit GenomeWalker™ utilisés pour obtenir les régions promotrices des deux gènes.

III.4 Synthèse de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

III.4.1 Oligonucléotides.

Les oligonucléotides utilisés dans ce travail ont été fournis par MWG (Tableau 14)

III.4.2 Réaction de PCR (Saiki, et coll., 1988).

La technique d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (ou technique de PCR) permet l'amplification, selon un mode exponentiel d'un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (*Taq* polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucléotidiques, capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence à amplifier, l'une avec le brin sens et l'autre avec le brin antisens, la taille des oligonucléotides utilisés comme amorces est généralement comprise entre 18 et 25 bases. La température utilisée pour l'hybridation des amorces sur la matrice d'ADN est égale à la température de dissociation des brins complémentaires (T_d) diminuée de 5°C. La température de dissociation est la température à laquelle 50% des molécules d'ADN sont dénaturées par rupture des liaisons hydrogène entre les brins. Pour les oligonucléotides de 10 à 20 bases, une approximation de la température de dissociation peut-être obtenue par la formule suivante :

$$T_d(^{\circ}\text{C}) = 4(\text{nombre de bases G et C}) + 2(\text{nombre de bases A et T})$$

La réaction de PCR « classique » est réalisée en trois étapes :

-1^{ère} étape : dénaturation thermique, l'ADN à amplifier est dénaturé par chauffage à 94°C pendant 2 min.

-2^{ème} étape : amplification de l'ADN. Après addition de 0,2 U de *Taq* polymérase (UptiTherm DNA Polymerase, interchim) l'ADN est amplifié pendant 35 cycles comportant : i) une étape de dénaturation thermique (94°C pendant 30 sec), ii) une étape d'hybridation des amorces (5°C en moins par rapport au T_d ; pendant 30 sec), iii) élongation à partir des amorces par la *Taq* polymérase (72°C de 30 sec à 2 min).

-3^{ème} étape : terminaison de la synthèse de l'ADN. La synthèse des brins d'ADN incomplet est achevée par l'action de la *Taq* polymérase à 72°C pendant 10 min.

La réaction de PCR en «Touchdown» est réalisée en quatre étapes :

-1^{ère} étape : dénaturation thermique, l'ADN à amplifier est dénaturé par chauffage à 94°C pendant 2 min.

-2^{ème} et 3^{ème} étapes : amplification de l'ADN.

7 cycles comportant les trois étapes i), ii) ,iii) citées précédemment sont réalisés avec un incrément de 1 degré de la température d'hybridation à chaque cycle.

Ceci permet de commencer l'amplification à des températures d'hybridation élevées et ainsi d'augmenter la spécificité de la réaction. Les temps de dénaturation, d'hybridation et d'élongation peuvent aussi être allongés pour augmenter l'efficacité de la réaction.

Puis 30 cycles sont réalisés de la même façon qu'en PCR classique.

-4^{ème} étape : terminaison de la synthèse de l'ADN. La synthèse des brins d'ADN incomplet est achevée par l'action de la *Taq* polymérase à 72°C pendant 10 min.

Tampon *Taq* polymérase (10X) :

KCl	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
Triton X-100	0,1% (v/v)
EDTA	1 mM
Glycerol 50%	(v/v)

Préparation des échantillons (volume réactionnel : 25 µl)

ADN à amplifier	50 ng
Amorce nucléotidique sens (10 pM)	1 µl
Amorce nucléotidique antisens (10 pM)	1 µl
Solution de désoxyribonucléosides phosphates (10 pM chacun)	1 µl
Tampon <i>Taq</i> polymérase (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 à 2 µl
DMSO	1,25 µl
H ₂ O mQ q.s.p	25 µl

La diminution de la concentration de MgCl₂ peut augmenter la spécificité de la réaction de PCR en diminuant la probabilité d'hybridation non spécifiques des amorces. L'ajout de DMSO peut faciliter l'action de la *Taq* au niveau des régions riches en nucléotides G et C.

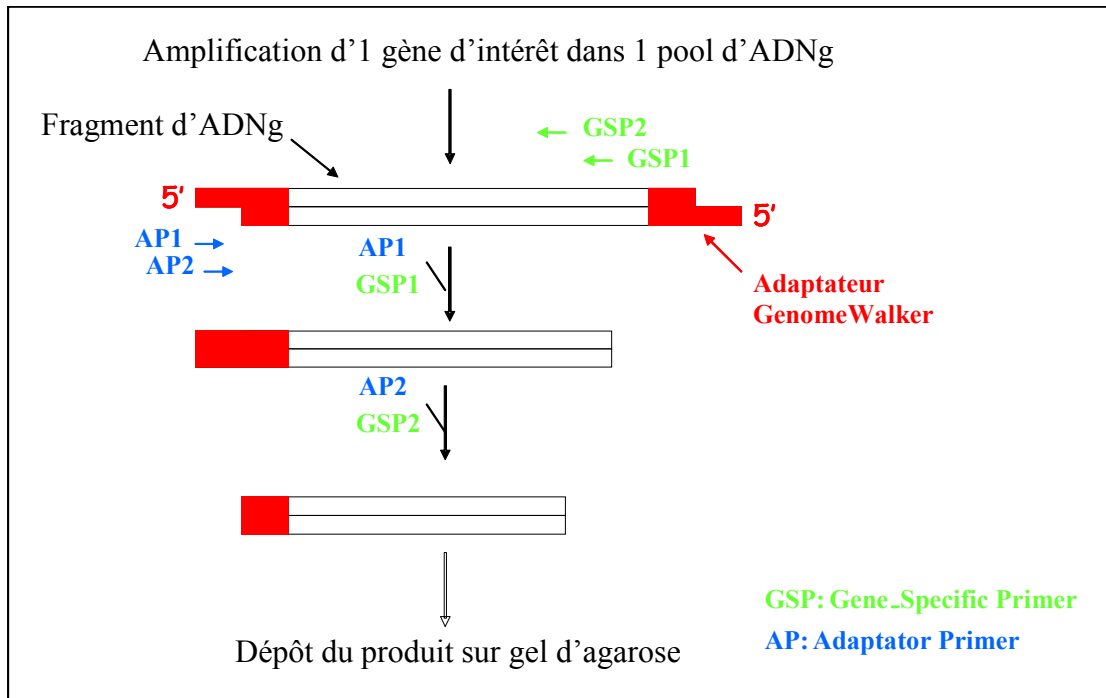


Figure 40 : Principe de la technique GenomeWalker™.

Deux PCRs successives sont réalisées à partir de fragments d'ADNg obtenus par digestion enzymatique. Les amorces sens sont les deux adaptateurs AP1 et AP2 fournis avec le kit GenomeWalker™, et les deux amorces antisens sont dessinées à partir de la séquence du gène d'intérêt.

III.4.3 Amplification de longs fragments d'ADN.

Les réactions de PCR réalisées dans le but d'amplifier de longs fragments requièrent un ADN matrice de bonne qualité et pur (génomique ou de BACs). L'utilisation d'un mélange (Expand™ 20 kb^{plus} PCR System, Roche) contenant deux ADN polymérases (*Taq* et *Pwo*) permet d'accroître la processivité et l'élongation sur des distances assez conséquentes (de 2 à une vingtaine de kpb). Le temps d'élongation est adapté en fonction de la taille des fragments à amplifier. La réaction est réalisée dans un volume de 50 µl et nécessite la confection de deux mélanges réactionnels effectués dans la glace afin d'éviter la dégradation des enzymes. Le premier mélange d'un volume de 25 µl contient l'ADN matrice (50 ng environ), les deux amorces (400 nM chacune), et les dNTPs (500 µM chacun). Ce premier mélange est chauffé 4 min à 95°C puis placé immédiatement sur la glace. Le second mélange contient le tampon 1X (Tris-HCl 4 mM pH 7,5, KCl 20 mM, EDTA 0,02 mM, DTT 2 mM, Tween® 20 (v/v), Nonidet® P40, Glycérol 20% (v/v)) et le mélange des deux ADN polymérases (2,6 unités). Les dix premiers cycles PCR se composent d'une dénaturation de 10 sec à 94°C, d'une hybridation des amorces de 30 sec à 62°C et d'une élongation de 5 à 20 min à 68°C. Ils sont suivis de 20 autres cycles réalisés dans les mêmes conditions exceptée la phase d'élongation qui est augmentée de 20 sec à chaque cycle.

III.4.4 Amplification des extrémités 5' promotrices des ADN.

Les régions promotrices des gènes ont été obtenues avec le kit « GenomeWalker™ » (Clontech) qui permet l'amplification jusqu'à 6 kb d'une séquence d'ADN génomique à partir d'une séquence d'ADNc connue (Siebert et al., 1995a, 1995b). Quatre bibliothèques « GenomeWalker™ » sont constituées à partir d'un ADN génomique bovin de très haute qualité et de haut poids moléculaire, digéré avec quatre enzymes de restriction, *EcoR* V, *Dra* I, *Pvu* II, *Ssp* I. Dans ce travail il s'agit d'une digestion de l'ADN d'un individu de race Parthenaise. Les extrémités franches des fragments d'ADN générées par ces digestions sont reliées à un adaptateur « GenomeWalker™ » (Figure 40), qui présente aux extrémités 5' la séquence des deux oligonucléotides, AP1 (Adaptator 1) et AP2 (Adaptator 2) qui seront utilisés ultérieurement en PCR, et en 3', un groupement amine qui prévient la formation d'un site AP1. Deux PCRs nichées sont alors réalisées : une PCR primaire à partir des quatre aliquots avec le couple d'amorces AP1/amorce 1 spécifique du gène étudié, puis une PCR

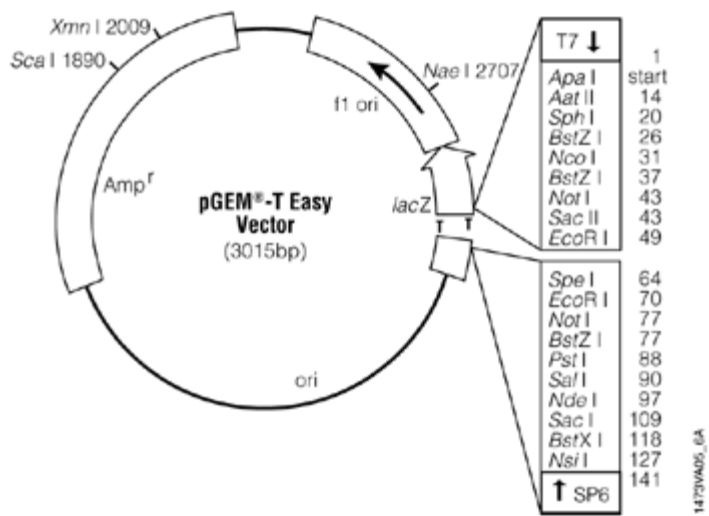


Figure 41: Carte du vecteur pGEM®-T Easy (Promega).

secondaire à partir d'1 µl du produit de PCR primaire avec le couple AP2/amorce 2 spécifique du gène.

Préparation de la PCR primaire (volume réactionnel : 25 µl) :

Digestions <i>EcoR</i> V, <i>Dra</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Ssp</i> I	1 µl
AP 1 (10 pM)	1 µl
Amorce 1 antisens spécifique du gène (10 pM)	1 µl
Solution de désoxyribonucléosides phosphates (10 pM chacun)	1 µl
Tampon <i>Taq</i> polymérase (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 à 2 µl
DMSO	1,25 µl
H ₂ O mQ q.s.p	25 µl

Préparation de la PCR secondaire (volume réactionnel : 25 µl) :

Produits des PCRs I <i>EcoR</i> V, <i>Dra</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Ssp</i> I	1 µl
AP 2 (10 pM)	1 µl
Amorce 2 antisens spécifique du gène (10 pM)	1 µl
Solution de désoxyribonucléosides phosphates (10 pM chacun)	1 µl
Tampon <i>Taq</i> polymérase (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 à 2 µl
DMSO 5%	1,25 µl
H ₂ O mQ q.s.p	25 µl

Ces amplifications sont réalisées avec des PCRs en « *Touchdown* » dont le protocole est décrit dans le chapitre III.4.2.

III.5 Ligatures.

III.5.1 Ligatures de fragments d'ADN à extrémités franches.

Les produits PCR élués sont ligaturés et clonés dans le vecteur pGEM® -T Easy Vector System II (Figure 41).

La liaison covalente d'un fragment d'ADN dans un vecteur est catalysée par l'ADN ligase du bactériophage T4 (Promega), qui permet la formation d'une liaison phosphodiester

entre les extrémités 3'OH et 5'phosphate des molécules d'acides nucléiques. Le rapport vecteur/insert varie de 1/5 à 1/10, avec environ 50 ng de vecteur. Une unité d'enzyme est utilisée, le mélange réactionnel étant incubé 1h à température ambiante.

III.5.2 Ligatures de fragments d'ADN à extrémités cohésives.

Pour présenter des extrémités compatibles, le vecteur et le fragment d'ADN à insérer sont préparés par digestion par des enzymes de restriction. Lorsque le vecteur est ouvert avec une seule enzyme de restriction, ses extrémités 5' sont déphosphorylées. Après préparation, les fragments d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose. La bande d'ADN est découpée puis purifiée avec le kit Qiagen. Les ligatures sont pratiquées dans un volume total de 20 µl dans les conditions suivantes :

-50 ng de vecteur déphosphorylé

-rapport fragment à insérer sur vecteur (mol/mol) entre 2 et 10

-2 µl de tampon 10X (60 mM Tris-HCl, pH 7,8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP

10% PEG

-2 µl d'enzyme T4 DNA Ligase (Promega)

Ce mélange réactionnel est laissé toute la nuit à une température de 15 °C.

III.6 Recherche de polymorphismes de type SNP (Single Nucléotide Polymorphism) par la technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

La technique de SSCP est basée sur la différence de migration électrophorétique de deux fragments d'ADN simple brin qui diffèrent d'une seule base. En effet, le changement d'un seul nucléotide va modifier la structure tertiaire de ces ADN simple brin qui seront séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. Ces mutations sont détectées par l'apparition de nouvelles bandes après coloration au nitrate d'argent.

Pour ces manipulations le kit « GeneGel SSCP Starter Kit » (Amersham Biosciences) est utilisé.

III.6.1 Préparation des échantillons et des standards.

Les PCRs sont réalisées pour amplifier les régions d'intérêt. La taille des fragments résultants ne doit pas excéder 500 pb. Ces échantillons sont dilués avec le tampon de charge (4,75 ml de formamide, 0,125 ml 1% (p/v) de xylène cyanol, 0,125 ml 1% (p/v) de bleu de

bromophénol) en proportion 1 : 1. Ils sont mélangés et chauffés 5 min à 95°C, et placés dans la glace afin de dénaturer les fragments d'ADN.

Le marqueur de taille (Amersham Biosciences) de 100 pb est aussi dilué avec le tampon de charge en proportion 1 : 1 mais il n'est pas dénaturé.

III.6.2 Préparation des gels

Le gel est réhydraté pendant 1 heure avec 15 ml de tampon de réhydratation A, B ou C. Cette réhydratation se fait avec agitation sur un plateau orbital afin d'homogénéiser la répartition du tampon.

III.6.3 Électrophorèse

L'excédent de tampon de réhydratation est oté avec du papier whatmann avant de déposer le gel sur l'appareil électrophorèse (GenePhor Electrophoresis Unit) préalablement mis à 15°C. Les puits sont placés à la cathode (-). Deux bandelettes imbibées avec 6 ml de tampon A, B ou C en fonction du tampon de réhydratation utilisé sont placées au niveau des deux électrodes. Les échantillons et le marqueur de taille sont ensuite chargés dans les puits selon des quantités n'excédant pas 6 µl. Le courant est appliqué et les conditions de migration dépendent des tampons de réhydratation du gel et des électrodes. Dans ce travail le tampon A été utilisé à chaque fois.

Conditions d'électrophorèse avec le tampon A :

	Température	voltage	courant	tension	temps
Phase 1	5 – 25°C	90 V	6 mA	5 W	25 min
Phase 2	5 – 25°C	500 V	14 mA	10 W	50 min

III.6.4 Coloration au nitrate d'argent

La détection des brins d'ADN simple brin se fait par une imprégnation à l'argent réalisée avec le kit « PlusOne DNA Silver Staining » (Amersham Biosciences). Le gel est fixé pendant 30 min minimum et sous agitation orbitale dans 25 ml d'une solution de fixation « fixing solution » (5X) d'acide benzenesulfonique à 0,6% diluée dans 100 ml d'éthanol à 24% (v/v). Cette solution est remplacée par 25 ml d'une solution d'imprégnation à l'argent « staining solution » (5X) composée de 0,2% (p/v) d'AgNO₃ et de 0,07% d'acide

bezensulfonique, diluée dans 100 ml d'eau distillée. Après 30 min sous agitation, le gel est lavé trois fois avec avec 150 ml d'eau distillée. Puis le gel est placé dans la solution de développement composée de 25 ml de « developing solution » (5X), 125 µl de sodium thiosulphate, 125 µl de formaldéhyde diluée dans 100 ml d'eau distillée. Cette solution est appliquée jusqu'à ce que les bandes imprégnées à l'argent apparaissent sur le gel, ce qui correspond à environ 5 min. Et enfin la réaction de développement est stoppée par une solution « stopping & preserving solution » qui est constituée de 75 ml d'acide acétique 1,0% (v/v), 5% d'acetate de sodium et de 10% de glycérol, diluée dans 100 ml d'eau distillée. Le gel peut rester dans cette solution plus de 24 heures.

III.7 Analyse génétique des microsatellites

L'amplification en PCR « *Touchdown* » de deux microsatellites a été réalisée sur une centaine d'individus avec deux oligonucléotides sens marqués avec deux fluorochromes distincts (Applied Biosystems) :

6-FAM™ qui est un fluorochrome bleu (longueur d'onde d'émission : 517 nm, longueur d'onde d'excitation : 494 nm) et VIC® qui est un fluorochrome vert (longueur d'onde d'émission : 553 nm, longueur d'onde d'excitation : 535 nm).

III.7.1 Préparation des échantillons :

III.7.1.1 Préparations des PCRs :

Les PCRs sont réalisées avec les Pre-aliquoted PCR Master Mix (ABgène) qui contiennent pour une réaction finale de 25 µl :

0,625 unités de *Taq* DNA Polymérase *Thermus aquaticus*

75 mM Tris-HCl pH 8,8

20 mM (NH₄)₂SO₄

1,5 mM MgCl₂

0,01% (v/v) Tween 20

0,2 mM de chaque dNTP

auxquels sont ajoutés :

1,25 µl DMSO

50 ng d'ADN génomique

1 µl d'amorce sens liée au fluorochrome 6-FAM™ (10 pM) ou VIC® (10 pM)

1 µl d'amorce antisens (10 pM)

Programme de la PCR « Touchdown » :

94°C 2 min

94°C 30sec

65°C-1°C 30sec

72°C 40sec

X7

94°C 30sec

58°C 30sec

72°C 40sec

X30

72°C 10 min

III.6.1.2 Préparation du marqueur de taille :

Les tailles des fragments PCR sont de 318 pb pour l'amplifiat obtenu avec l'oligonucléotide marqué 6-FAM™ et 290 pb pour l'amplifiat obtenu avec l'oligonucléotide marqué VIC®.

Le marqueur de taille choisi est le GeneScan-500 LIZ® qui est un fluorochrome orange et qui permet d'estimer la taille des échantillons d'ADN de 50 à 500 pb. Il produit 9 pics électrophorétiques correspondant à des fragments d'ADN simple brin de 35 pb à 500 pb.

0,5 µl de GeneScan-500 LIZ® sont mélangés à 12 µl de Formamide Hi-di.

III.7.1.3 Préparation des échantillons pour le génotypage.

Après homogénéisation de la solution de marqueur de taille, 12 µl sont prélevés et ajoutés à 1 µl de chaque produit PCR. Chaque échantillon est mélangé et chauffé à 95°C pendant 2 min avant d'être placé dans la glace.

III.7.2 Analyse bioinformatique des microsatellites.

Les différents échantillons génotypés sont analysés avec le système GeneScan ABIPrism® 310. Les échantillons marqués en 5' par le fluorochrome 6-FAM™ ou VIC® vont être excités par un laser et émettre une fluorescence dans le bleu ou le vert respectivement, qui sera collectée par une caméra. En fonction de l'intensité de cette fluorescence, le logiciel interprète et « positionne » un pic électrophorétique correspondant à

l'échantillon. La taille exacte de l'échantillon pourra être estimée par rapport aux différents pics du marqueur de taille 500 LIZ® dont on connaît la valeur.

III.8 Hybridation moléculaire sur membrane.

III.8.1 Transfert de fragments d'ADN de BAC sur une membrane de nylon (méthode de Southern, 1975)

Après électrophorèse en gel d'agarose à 0,8%, les fragments digérés d'ADN de BACs sont transférés sur une membrane de Nylon (Hybond-N⁺, Amersham). Avant le transfert le gel est plongé deux fois dans un bain de soude 0,4 N et de NaCl 1 M pendant 15 min afin de dénaturer l'ADN. Le transfert s'effectue passivement par capillarité pendant la nuit par perfusion du gel par cette même solution. La membrane est ensuite rincée pendant 15 min avec une solution de Tris-HCl 0,5 M pH 5,2 et de NaCl 1 M afin de neutraliser la membrane et d'oter toute trace d'agarose qui pourrait subsister. Cette membrane est séchée quelques instants et l'ADN est fixé par irradiation UV (UV Stratalinker).

III.8.2 Hybridation de l'ADN avec une sonde ADN radio-marquée.

L'hybridation est réalisée dans un four à hybridation rotatif (Appligène) avec la solution d'hybridation.

Solution d'hybridation:

Na ₂ HPO ₄ (12H ₂ O)	1,38 g
SDS 10%	1,07 ml
Sulfate de dextran	0,75 g
BSA	0,15 g
ADN de sperme de saumon(100 µg/ml)	300 µl
H ₂ O mQ q.s.p	15 ml

1^{ère} étape : préhybridation. La membrane recouverte avec la solution d'hybridation est incubée dans cette solution pendant 4 heures à 65°C (0,75 µl de solution/cm² de membrane).

2^{ème} étape : hybridation spécifique avec la sonde. La sonde radioactive est dénaturée pendant 5 min à 95°-100°C, puis ajoutée au milieu de préhybridation et l'hybridation de la membrane est prolongée pendant 14-16 heures à 65°C.

3^{ème} étape : lavages. L'excès de sonde et la sonde hybridée de manière non spécifique sont éliminées par des lavages de force ionique décroissante dans des solutions obtenues par dilution d'une solution de SSC 2X (citrate de sodium 0,03 M, NaCl 0,3 M, pH 7,0). La membrane est soumise successivement à :

- deux lavages en SSC 2X pendant 10 min à 65°C
- deux lavages en SSC 1X pendant 10 min à 65°C
- un lavage en SSC 1X, 0,1% SDS pendant 15 min à 65°C
- un lavage en SSC 1X, 0,01% SDS pendant 20 min à 65°C

4^{ème} étape : révélation. La membrane essorée mais humide, est enveloppée dans un film plastique. Elle est mise en autoradiographie (Hyperfilm MP X-ray, Amersham) à - 80°C avec des écrans intensificateurs (Hyperscreen, Amersham) de 2 à 24 heures environ en fonction de l'intensité du marquage radioactif. Si nécessaire les rinçages peuvent être poursuivis ou la membrane peut-être déshybridée par un lavage en SDS 1% à 80°C deux fois 2 min. La membrane peut alors être hybridée avec une nouvelle sonde.

III.8.3 Marquage radioactif des fragments d'ADN par amorçage au hasard.

Le kit « Random Primers DNA Labelling System » (Life Technologies) a été utilisé pour le marquage radioactif des fragments d'ADN. Cette méthode utilisable pour des fragments de plus de 50 nucléotides permet de marquer 25 ng d'ADN avec une activité spécifique d'environ 10⁹ dpm/µg. Les fragments d'ADN utilisés pour le marquage (25 à 50 ng dans un volume inférieur à 25 µl) sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min. La renaturation de l'ADN est empêchée par refroidissement immédiat à 4°C. Le fragment dénaturé est mis en présence d'un mélange d'héxanucléotides présentant des séquences aléatoires qui s'hybrident au hasard sur chacun des brins. Ces oligonucléotides hybridés servent d'amorces pour la synthèse d'un brin d'ADN par le fragment de Klenow qui incorpore les désoxynucléotides présents dans le milieu. L'incorporation du [α -³²P]dCTP permet le marquage radioactif de l'ADN synthétisé suivant le procédé :

- | | |
|---|--------------------|
| - ADN dénaturé (25 à 50 ng) | ≤ 25 µl |
| - Mélange réactionnel (héxanucléotides) | 15 µl |
| - dATP, dTTP, dGTP (chacun) | 2 µl |
| - [α - ³² P]dCTP (3000 Ci/mme) | 2,5 µl (2,5 µCi) |
| - H ₂ O volume ajusté à | 49 µl |
| - Fragment de Klenow | 1 µl (environ 6 U) |

Après incubation de 1 h à 37°C, le [α -³²P]dCTP non incorporé peut être éliminé par purification par le kit « QIAquick Nucleotide Removal » (Qiagen).

Pour pouvoir s'hybrider, la sonde doit subir une dénaturation thermique (5 min à 95-100°C).

III.9 Techniques relatives aux ARNs.

III.9.1 Extraction des ARNs totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide d'une solution de TRIzol® (contenant du phénol et de l'isothiocyanate de guanidine, Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. L'ensemble du matériel plastique à usage unique est conditionné avec des gants et autoclavé 30 min à 121°C afin de se prémunir d'activités RNases contaminantes. Les solutions, utilisés au cours de la purification des ARN sont traités par le diéthyl de pyrocarbonate, DEPC, au 1/1000 (v/v) (Sigma), 12 h à température ambiante. Ce puissant inhibiteur de RNases est inactivé par autoclavage 20 min à 121°C.

Les fragments de tissus sont décongelés et homogénéisés dans du TRIzol® avec l'Ultraturax selon un rapport 100 mg de tissu pour 1 ml de TRIzol®. Après une incubation de 5 min à température ambiante, du chloroforme est ajouté selon un rapport de 0,2 ml pour 1 ml de TRIzol® et la préparation est vortexée puis centrifugée afin de récupérer uniquement la phase aqueuse dans laquelle se trouvent les ARN totaux. 0,5 ml d'isopropanol sont ajoutés pour 1 ml de TRIzol® initial. Une incubation de 10 min à température ambiante suivie d'une centrifugation à 12000xg, 15 min à 4°C sont réalisées. Le culot obtenu est lavé à l'éthanol 75% (v/v). Après agitation et centrifugation, ce culot est rapidement séché à l'air et repris dans de l'eau RNase free.

Leur concentration est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm. Les ARN totaux en solution sont conservés à - 80°C.

III.9.2 Réaction de Transcription inverse par RT-PCR

III.9.2.1 Synthèse d'ADN complémentaire simple brin

Afin de générer des fragments d'ADN complémentaire simple brin à partir des ARN totaux, une transcription inverse est réalisée avec le kit « SuperScript™ II Reverse Transcriptase » (Invitrogen). Dans un tube eppendorf propre et dépourvu de nucléase, 1 ng à 5

µg d'ARN totaux sont ajoutés à 1 µl d'Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml), 1µl de dNTP (10 mM chacun), le tout complété à 20 µl avec de l'eau distillée. La solution est chauffée à 65°C pendant 5 min et immédiatement placée dans la glace pendant 2 min. Après une brève centrifugation, 4 µl de tampon 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) sont ajoutés, 2 µl de DTT 0,1 M et 1 µl de RNase out (40 unités). Le tube est chauffé à 42°C pendant 2 min après avoir bien homogénéisé son contenu. 1 µl de SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 unités) est ajouté en pipettant délicatement afin de bien éjecter la totalité de l'enzyme et l'échantillon est placé à 42°C pendant 50 min, température optimale de l'activité de l'enzyme. La réaction est inactivée en chauffant à 70°C pendant 15 min.

A la fin de la manipulation, 1 µl (2 unités) de RNase H peuvent être ajoutés afin d'éliminer totalement les ARN résiduels. L'échantillon est alors incubé à 37°C pendant 20 min puis repris dans 20 µl d'eau dépourvue de RNases.

Les ADNc peuvent être conservés à – 20°C ou directement utilisés en PCR.

III.9.2.2 Réaction de PCR à partir des ADNc synthétisés

La réaction de PCR est réalisée dans un volume de 50 µl final avec 2 µl de l'échantillon d'ADNc synthétisés, dans les mêmes conditions décrites dans le chapitre III.4.2 avec la *Taq* polymérase UptiTherm DNA Polymerase (Interchim). Un échantillon de la réaction terminée est déposé sur gel d'agarose, et si aucun signal n'est obtenu, une PCR secondaire est réalisée à partir du produit de PCR primaire et deux oligonucléotides internes sur la séquence à amplifier. Il est très fréquent d'effectuer une PCR secondaire quand les ARN sont très peu exprimés dans les tissus étudiés.

Nom de la molécule Fluorescente	λ excitation (nm)	λ émission (nm)	λ détection (nm)	couleur détectée
RG6				
N,N'-diéthyl-2',7'-diméthyl-6- carboxyrhodamine	520	545	560	vert
R110				
6-carboxyrhodamine	500	530	531	bleu
TAMRA				
N,N,N',N'-tétraméthyl-6- carboxyrhodamine	555	580	580	jaune
ROX				
6-carboxy-X-rhodamine	585	605	610	rouge

Tableau 15: Caractéristiques des marqueurs fluorescents des didésoxynucléotides.

RG6 pour l'adénine, ROX pour la thymine, R110 pour la cytosine et TAMRA pour la guanine. (La chimie du marquage est celle de Perkin Elmer)

III.10 Séquençage d'ADN selon la méthode de Sanger et coll., 1977 (analyse par électrophorèse capillaire).

Le séquençage est réalisé par la méthode des didésoxyribonucléotides (Sanger et coll., 1977). Ceux-ci sont marqués par des molécules fluorescentes dont les caractéristiques sont décrites dans le Tableau 15. Ils sont incorporés dans les fragments d'ADN synthétisés par l'AmpliTaq DNA Polymerase FS, adaptée au séquençage en présence de nucléotides marqués par des molécules fluorescentes, au cours de cycles d'amplification PCR, réalisés dans un thermocycler. Le protocole de la réaction est celui du kit de séquençage « ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit » (Perkin Elmer). Une amorce, complémentaire d'une région située en 5' ou 3' du site multiple de clonage d'un vecteur ou d'un fragment d'ADN résultant d'une amplification PCR, est hybridée à l'ADN matrice rendu simple brin à la suite d'un traitement par la chaleur (5 min à 100°C). En présence des 4 dNTPs, l'ADN polymérase initie l'élongation à partir de l'extrémité 3'-OH libre de l'amorce hybridée. L'incorporation d'un des quatre didésoxyribonucléotides (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP) entraîne l'arrêt de l'élongation et ceci de façon aléatoire.

Les réactions de séquençage sont réalisées avec un automate PCR « GeneAmp PCR System 9600 ou 480 » (Perkin Elmer) à partir de 50 à 600 ng d'ADN matrice (la quantité varie suivant si l'on s'adresse à un amplifiat PCR, un ADN plasmidique ou de l'ADN de BAC), en utilisant le mélange réactionnel composé de 3 µl de mix Big Dye Terminator contenant les dNTPs, ddNTPs, du MgCl₂ et l'ADN polymérase (*Taq*), 5 pmoles d'amorce et 1 µl de tampon 5X (Tris-HCl 400 mM pH 9,0, MgCl₂ 10 mM), complété à 20 µl avec de l'eau mQ. La réaction consiste en 25 cycles, dénaturation 10 sec à 95°C, hybridation de l'amorce 5 sec à 55°C et élongation par l'ADN polymérase 4 min à 60°C. La réaction est un peu différente lorsqu'il s'agit d'une réaction de séquençage sur BAC, puisque le mix Big Dye Terminator remplace le tampon 5X et la réaction passe à 45 cycles avec une étape de dénaturation 30 sec à 95°C, d'hybridation à 55°C et d'élongation 4 min 30 à 60°C.

Les deux types de réaction peuvent être précédées par une étape supplémentaire de dénaturation de 3 min à 95°C.

Le milieu réactionnel est ensuite précipité par 4 volumes d'isopropanol à 75% pendant 15 min à température ambiante. Le culot obtenu après une première centrifugation de 25 min à 13000xg et à 4°C est lavé avec 250 µl d'isopropanol à 75% et resuspendu. Après une

deuxième centrifugation de 15 min à 13000xg le culot est séché à température ambiante, repris dans 20 µl de solution dénaturante (Template Suppressor Reagent) et dénaturé 3 min à 96°C avant d'être placé dans la glace. L'échantillon est ensuite chargé dans l'appareil de séquençage.

Les séquences sont analysées à l'aide d'un système automatique composé d'un appareil d'électrophorèse capillaire couplé à un système de détection de fluorescence (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer) et d'un logiciel d'acquisition et d'analyse de données (ABI PRISM™ GeneScan Analysis, Perkin Elmer) opérant sur un ordinateur. Les marqueurs sont excités par un rayon laser et des filtres virtuels de détection de la fluorescence permettent de détecter chaque marqueur dans sa zone de longueur d'onde d'émission maximale. L'appareil détecte des couleurs dans l'ordre des longueurs d'onde croissantes (bleu, vert, jaune et rouge, Tableau 15).

Méthodes biochimiques.

IV.1 Production et purification de GDF-8 bovine recombinante.

IV.1.1 Induction de la production de la protéine recombinante.

2 ml d'une préculture d'une nuit de bactéries de souches BL21 contenant le plasmide recombinant sont inoculés à 200 ml de LB / kanamycine à 30 µg/ml, et sont mis en culture à 37°C avec agitation à 250 rpm pendant 4 heures. Lorsque la $DO_{550} \geq 0,4$, l'expression de la protéine recombinante est induite par l'IPTG (Gibco BRL) à 0,5 mM final pendant 2 heures, à 37°C et avec agitation. En fin d'induction les bactéries sont centrifugées pendant 5 min à 12000xg et le culot est récupéré et stocké à -80°C ou directement analysé en SDS-PAGE ou utilisé pour la purification de la protéine recombinante.

IV.1.2 Analyse des protéines en gel de polyacrylamide.

L'analyse des protéines en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS/PAGE) permet la séparation des protéines essentiellement en fonction de leur taille. Ici, la migration électrophorétique indiquera la présence ou non de la protéine induite et la taille de cette protéine.

Le culot est repris dans 100 µl de tampon de charge (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,1%, glycérol 10%) et 10 µl de DTT à 100 mM. L'échantillon est chauffé à 100°C pendant 5 min et déposé sur un gel d'acrylamide à 16%.

gel d'acrylamide 16%	résolution 16%	concentration 5%
H ₂ O distillée stérile	2,5 ml	3,63 ml
Acrylamide/bis-acrylamide (40%)	3 ml	625 µl
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3,75 ml	-
Tris-HCl 1 M pH 6,8	-	630 µl
SDS 20% (p/v)	150 µl	25 µl
A.P.S 10% (p/v)	300 µl	50 µl
Temed	6 µl	5 µl
H ₂ O q.s.p	25 ml	10 ml

Le gel de résolution, dont la polymérisation commence dès l'addition de l'A.P.S et du Temed, est coulé entre deux plaques de verre et recouvert d'isobutanol saturé en eau. Ceci permet une répartition parfaitement plane du gel et empêche le contact avec l'air qui inhibe la polymérisation. Dès que la polymérisation est complète, l'isobutanol est éliminé par rinçages successifs avec de l'eau distillée. Le gel de concentration est alors coulé et surmonté d'un peigne qui formera les puits dans lesquels seront chargés les échantillons.

La migration électrophorèse s'effectue pendant 1h30 sous un courant de 20 mA, dans un tampon (5X) composé de :

-Tris base : 124 mM

-Glycine : 96 mM

-SDS : 0,1% (p/v)

Après migration, les protéines incluses dans le gel sont fixées (éthanol 50%, acide acétique 10%, H₂O 40%) et colorées au bleu de Coomassie (50 mg de brillant blue G dans 200 ml d'acide acétique 10%). Le gel est enfin décoloré dans une solution d'acide acétique 10% pour la visualisation des profils protéiques.

IV.1.3 Purification de la protéine recombinante.

IV.1.3.1 Récupération des corps d'inclusion produits par les bactéries

Le culot de bactéries contenant le plasmide recombinant est repris dans du tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, les parois bactériennes sont perméabilisées par sonication (3 x 20 sec) et tous les éléments sont récupérés par centrifugation à 12500 rpm pendant 10 min. Le culot est lavé deux fois avec un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, Triton X100 0,5% par incubation dans la glace 15 min suivie d'une centrifugation à 12500 rpm pendant 10 min.

IV.1.3.2 Solubilisation des corps d'inclusion

La solubilisation des corps d'inclusion se fait en conditions dénaturantes en présence d'Urée 6 M et de Tris-HCl 50 mM pH 8 à 4°C avec agitation durant 30 min. Après une centrifugation à

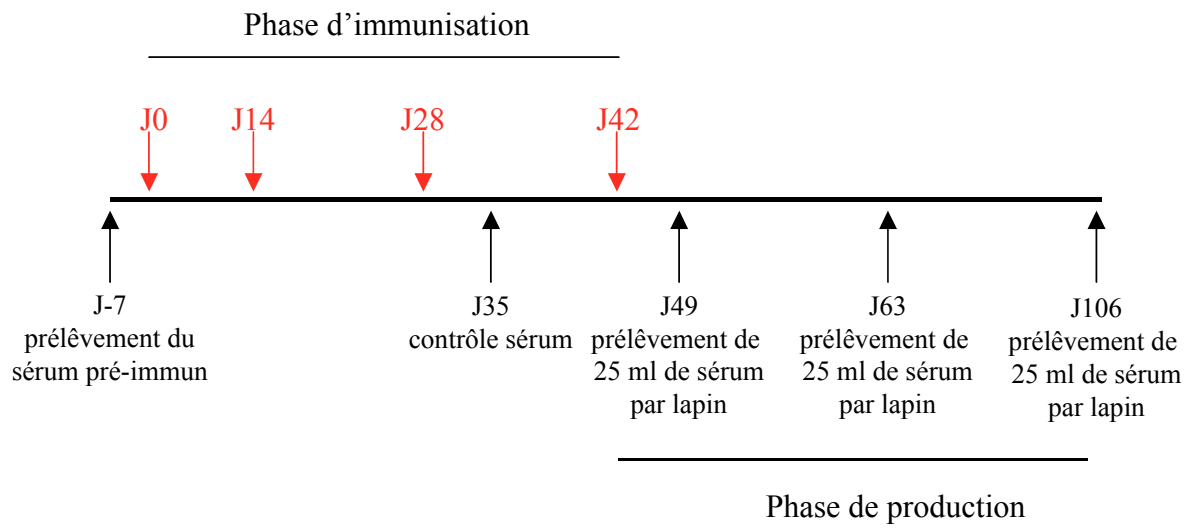


Figure 42: Protocole d'immunisation des lapins (AGRO-BIO), pour la production d'anticorps anti-myostatine bovine.

12500 rpm pendant 10 min, les surnageants qui contiennent les protéines sont prélevés et chargés dans des colonnes de cellulose (Spectra/Por®, Float-A-Lyser™, Spectrum®) dont les pores retiennent les protéines de poids moléculaires supérieures à 5000 Daltons. Une dialyse est alors réalisée pendant une nuit à 4°C et avec agitation contre un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, DTT 1 mM permettant de purifier, en partie, la protéine d'intérêt.

Un échantillon de cette dialyse peut-être déposée sur gel de polyacrylamides 16% pour vérifier si la dialyse a été efficace et suffisante et bien sur si la protéine recombinante a bien été produite (cf chapitre IV.1.2).

IV.1.3.3 Dosage des protéines : méthode de Bradford (1976).

Après dialyse les protéines sont dosées avec le réactif de Bradford (Sigma-Aldrich) afin d'estimer leur concentration. Une gamme étalon de BSA (Bovin Serum Albumin) variant de 0 à 8 µg/ml est réalisée avec le tampon de dialyse (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, DTT 1 mM), dans un volume final de 1 ml. Les échantillons protéiques sont également dilués dans le tampon de dialyse avant d'ajouter le réactif de Bradford et de lire l'absorbance à 595 nm. La concentration protéique de chaque essai est estimée par rapport à la droite étalon obtenue avec la gamme BSA, après élimination de la valeur de l'absorbance du témoin blanc ne contenant que du tampon de dialyse et du réactif de Bradford.

IV.2 Production d'Anticorps polyclonaux.

L'immunisation des lapins et l'obtention des anticorps polyclonaux ont été réalisés au cours de l'année de D.E.A de Frédéric Varnat.

1 mg de rGDF-8 purifiée a été injecté à deux lapins selon le protocole donné par AGRO-BIO (Figure 42)

Au cours de ce travail, seuls les anticorps des sérums obtenus au 63^{ème} et 106^{ème} jours après le début de l'immunisation ont été purifiés avec le système HiTrap® protein G affinity columns (Pharmacia Biotech), dont le principe repose sur l'utilisation de colonnes de chromatographie d'affinité greffée avec de la protéine G. Cette protéine est originellement exprimée à la surface des bactéries *Streptococcus* et correspond à un récepteur reconnaissant la région constante Fc des immunoglobulines de classe G. Dans les colonnes, elle est greffée sur des billes d'agarose et permet la purification des IgG.

Avant utilisation, la colonne est rincée avec 20 ml de tampon de fixation (phosphate de sodium 20 mM, pH7) pour éliminer l'éthanol dans lequel le support d'agarose est conservé. Le sérum à partir desquels les IgG vont être purifiées est préalablement filtré sur des filtres de diamètre de pores 45 µm. Il est déposé à la surface du gel, et après absorption du dépôt, celle-ci est lavée avec 5 ml de tampon de fixation. Les anticorps retenus par la protéine G sont alors élués avec 5 ml de tampon d'éluion : Glycine 0,1 M pH 2,7. Les IgG ainsi décrochées de la colonne sont collectées par fraction de 1 ml dans des tubes Eppendorf contenant préalablement 75 µl de tampon de neutralisation : Tris-HCl 1 M, pH 9.

La colonne est ensuite régénérée avec 2 ml de tampon d'éluion, puis 5 ml de tampon de fixation et enfin de l'éthanol 20%. Elle peut être conservée à 4°C.

IV.3 Quantification de la protéine recombinante rGDF-8 et titrage des anticorps purifiés par la technique ELISA.

Les concentrations optimales en anticorps primaires, permettant la saturation de tous les sites antigéniques, sont préalablement déterminées. Pour cela, différents essais sont réalisés en faisant varier la quantité de l'antigène rGDF-8 adsorbée par la plaque (12 dilutions à partir d'une concentration à 200 ng/ml) et en faisant varier la concentration d'anticorps primaires (12 dilutions à partir d'une première dilution au 1/100°). La concentration d'anticorps secondaire restant fixe (1/1500°).

Pour chaque essai, cinq témoins sont réalisés :

- *témoin n°1* : témoin blanc : le puits correspondant ne contient que le TMD (réactif de révélation).
- *témoin n°2* : puits où l'antigène adsorbé est mis en présence de l'anticorps primaire et du TMD, sans anticorps secondaire.
- *témoin n°3* : puits où l'antigène adsorbé est mis en présence de l'anticorps secondaire et du TMD, sans anticorps primaire.
- *témoin n°4* : puits ne contenant pas d'antigène, mais uniquement les anticorps primaire, secondaire et du TMD.
- *témoin n°5* : puits ne contenant que l'antigène et du TMD, sans les anticorps primaire et secondaire.

Dans un premier temps, l'antigène r-GDF-8 dilué dans le tampon Na₂CO₃ 50 mM pH 9,6 est adsorbé pendant une nuit à 4°C sur la plaque ELISA (plaque de type Polysorb, puits en

forme de « U » Nunc), à raison d'un volume de 200 µl par puits. Ensuite deux lavages de 30 sec sont réalisés avec du tampon PBS-Tween 0,05% (v/v), préparé à partir de Tween 20, afin d'éliminer l'excès d'antigène. Une saturation des sites non spécifiques est effectuée pendant 30 min à 37°C avec du PBS-Tween 0,05% - BSA 5% (p/v), avant de refaire deux lavages comme précédemment. L'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS-Tween 0,05% - BSA 1% est ensuite ajouté dans chaque puits pendant 2 heures à 37°C. Après deux lavages, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dilué dans la même solution, est ajouté, et le mélange est incubé 1 heure à 37°C. Après deux lavages au PBS-Tween, la révélation se fait à l'obscurité avec 200 µl de TMD préparé en diluant un comprimé de réactif dans 10 ml de tampon fournit dans le kit (SANOFI Diagnostics Pasteur). La réaction colorée est stoppée après 5 min en ajoutant 100 µl de H₂SO₄ 2M. L'intensité de la coloration proportionnelle à la quantité d'antigène est déterminée sur un lecteur de plaque (Dymex) à 450 nm, en prenant comme référence (valeur de DO = 0) le puit ne contenant que le TMD (témoin n°1).

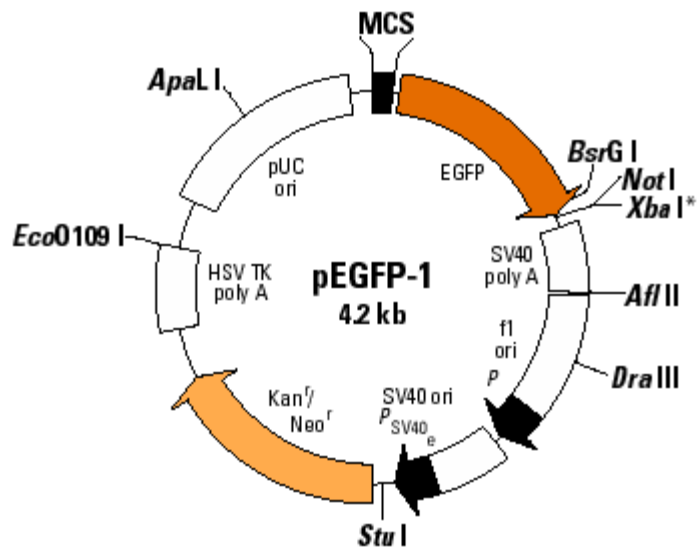


Figure 43: Carte du vecteur pEGFP-1 (Clontech).

Méthodes de biologie cellulaire.

Des transfections dans les cellules COS-7 (cellules transformées de reins de singe) sont réalisées afin de mesurer l'activité promotrice du gène *ACVR2B* bovin. Différentes constructions sont réalisées et sont clonées directionnellement dans le vecteur pEGFP-1, grâce à l'incorporation des sites de restriction BamH1 et HindIII dans la séquence des oligonucléotides utilisés pour réaliser les différentes PCRs (Figure 43). Le vecteur pEGFP-1 ne possède pas de promoteur et exprime une protéine modifiée de la GFP, l'EGFP, ce qui permettra de quantifier les activités promotrices des différentes constructions par la technique de cytométrie en flux.

Quatre constructions sont réalisées et clonées dans le vecteur pEGFP-1 :

(1076)délétionACACGC/(1593)T	}	constructions natives
(1076)insertionACACGC/(1593)C		
(1076)délétionACACGC/(1593)C	}	constructions chimères
(1076)insertionACACGC/(1593)T		

Les chiffres représentent la position des SNPs dans la séquence de référence du gène *ACVR2B* (AY775793).

Les constructions chimères ont été obtenues par digestion enzymatique avec les enzymes de restrictions AccIII en position 1315 et BamH1 à l'extrémité 3' suivie d'une ligature dirigée dans le vecteur pEGFP-1.

Le témoin positif est obtenu par l'activité du promoteur CMV (*cytomégalo*virus) cloné dans le vecteur pEGFP-1 devant le gène rapporteur.

Le témoin négatif représente l'activité du vecteur pEGFP-1 sans insert, et l'intensité de fluorescence du gène rapporteur EGFP sera corrélée à l'activité promotrice de chaque construction afin d'estimer l'intensité de fluorescence des cellules testées pour chaque essai.

V.1 Transfections transitoires des cellules COS-7 adhérentes

Le jour précédent la transfection des cellules COS-7, les cellules sont comptées sur une cellule de Malassez afin d'êtreensemencées à une densité de 10^5 cellules /ml.

10 µg d'ADN sont dilués dans 300 µl de DMEM minimum (Dulbecco Modified Essential Medium, Eurobio) contenant du glucose à 4,5 g/l, et 25 µl d'agent transfectant, le Polyfect® (Qiagen) sont ensuite ajoutés à cette solution qui est incubée pendant 10 min à

température ambiante après homogénéisation. Le complexe Polyfect® /ADN chargé positivement va se fixer sur les récepteurs membranaires chargés négativement et pénétrer dans les cellules jusqu'au noyau. Pendant ce temps, le milieu de culture des cellules est aspiré et remplacé par 5 ml de PBS stérile pour laver les cellules puis par 7 ml de DMEM complet.

Milieu complet :
-sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté 20% (v/v) (Boehringer)
-acides aminés 1X (v/v) (Eurobio)
-streptomycine / pénicilline 1U (v/v) (Gibco)
-glutamine 2 mM (Gibco)
-glucose 4,5 g/l

La solution contenant les complexes de transfection additionné d'1 ml de milieu complet qui stoppe la réaction est alors ajouté sur les cellules et laissée incuber 48 h dans l'étuve à 37°C et sous 5% de CO₂.

Les cellules transfectées sont alors lavées une première fois avec 5 ml de PBS stérile puis une deuxième fois avec 2,5 ml de PBS-EDTA stérile, avant d'être décollées de leur support par une solution de trypsine-EDTA 1 X pendant quelques instants à 37°C. Elles sont ensuite centrifugées à 1200 tours / min après avoir ajouter 4 ml de DMEM complet qui stoppe l'action de la trypsine. Enfin, le surnageant est aspiré, les cellules sont resuspendues dans 5 ml de DMEM complet, centrifugées, et lavées deux fois avec du PBS stérile.

Les cellules en suspension dans 4 ml de PBS peuvent être observées en cytométrie en flux après ajout de l'iodure de propidium à 15 µg/ml qui marque les cellules mortes.

V.2 Analyse de l'activité du promoteur par cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique dynamique destinée à l'analyse rapide et individuelle d'éléments (cellules ou constituants cellulaires) en suspension. Les analyses par cytométrie en flux ont été effectuées pour mesurer les intensités de fluorescence de populations cellulaires marquées par un fluorochrome vert, l'EGFP, et après coloration par l'iodure de propidium. Ces analyses sont réalisées à l'aide du cytomètre en flux FACS Vantage (Becton-Dickinson). L'excitation de l'EGFP ou de l'iodure de propidium est réalisée avec la raie à 488 nm d'un laser à argon. L'émission de fluorescence verte de l'EGFP est recueillie à l'aide d'un filtre « passe-bande » (530 ± 15 nm), tandis que la fluorescence rouge-

orange émise par l'iodure de propidium est collectée à l'aide d'un filtre « passe-haut » de 600 nm. Les fluorescences vertes et rouges sont collectées et les signaux électriques résultant sont multipliés avec des « systèmes » logarithmiques. La vitesse de défilement pour l'analyse des cellules est de 500/sec. Chaque analyse porte sur 10^4 événements, après élimination électronique des débris et des agrégats sur une fenêtre d'intérêt d'un cytogramme de diffusion de la lumière à petit angle et à angle droit. L'intensité de la lumière diffusée à petit angle par rapport au rayonnement laser incident (FSC) peut-être corrélé à la taille de la cellule. La lumière diffusée à angle droit (SSC) par rapport au rayon laser incident, peut être associé à la structure cellulaire. Ce paramètre renseigne sur le contenu cellulaire. Les signaux de diffusion sont amplifiés linéairement eu cours de l'analyse des cellules. Pour chaque paramètre analysé (diffusion, fluorescence), des statistiques (effectif, moyenne, intensité) sont réalisées sur les cytogrammes et/ou histogrammes correspondants.

NOUVEAU
CHAPITRE DE
LA THÈSE

Place et enjeux de la thèse

"Organisation, expression et polymorphismes des gènes *ACVR2B* et *FST*, intervenant dans la voie de signalisation de la myostatine (GDF-8). »

La myostatine (GDF-8) est un membre de la superfamille des TGF- β s (Transforming Growth Factor- β) qui sont des facteurs de croissance et de différenciation cellulaires impliqués dans de nombreux processus biologiques. La myostatine est principalement exprimée dans les cellules musculaires squelettiques, au cours du développement musculaire mais aussi après la naissance. C'est une protéine sécrétée qui est un régulateur négatif majeur de la masse musculaire.

Diverses mutations détectées dans la séquence du gène codant la myostatine ont été identifiées comme responsables d'une hypertrophie musculaire chez le bovin. Cependant, dans certaines races, ce phénotype peut être observé sans qu'aucune des mutations dans le gène codant la myostatine ne soit responsable. Notre travail s'est basé sur l'hypothèse que d'autres mutations susceptibles d'affecter la fonctionnalité des partenaires de la voie de signalisation de la myostatine pouvaient être impliquées dans l'apparition du phénotype « hypermusclé » chez ces bovins.

Ainsi nous avons préférentiellement dirigé nos recherches sur l'étude de deux gènes. Le gène *ACVR2B*, codant le récepteur de la myostatine, et le gène *FST*, qui code la follistatine, une protéine antagoniste de la myostatine.

Ces deux gènes ont été prioritairement exploités pour la recherche de polymorphismes associés au phénotype de fort développement musculaire dans une population d'animaux sélectionnés qui ne possèdent aucune mutation dans le gène codant la myostatine.

Cette thèse a été réalisée au sein de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale de l'UMR 1061 qui est une unité mixte de recherche Université/ INRA (Institut National de Recherche Agronomique). A l'INRA plusieurs équipes travaillaient déjà sur des sujets étudiants les rôles de la myostatine dans le développement musculaire. Au niveau international deux grandes équipes publient régulièrement des résultats scientifiques sur ce

sujet. Aussi, le rattachement du laboratoire à l'INRA avant mon arrivée, a permis l'élaboration de ma thématique de thèse dans ce contexte national et international, et a permis, la mise en place de collaborations, en particulier avec les chercheurs du site INRA de Clermont-Ferrand et de Jouy-en-josas avec lesquels nous avons pu dialoguer à quelques reprises et partager des outils biologiques indispensables à l'avancée de nos travaux.

L'intérêt de ce travail est d'approfondir les connaissances des mécanismes moléculaires intervenants dans l'apparition du phénotype de fort développement musculaire chez le bovin. En effet, ces animaux représentent un atout économique important pour certains pays puisque leurs muscles superficiels sont très développés et donnent une viande à la tendreté et aux propriétés gustatives jugées favorables. Cependant cette forte augmentation de masse musculaire, d'environ 20%, engendre des points plus négatifs, tels que la diminution de la taille de certains organes internes, ou encore les difficultés de vêlage liées à la taille des veaux, qui ont soulevé des interrogations d'ordre éthique et ont amené certains producteurs à juger cette condition comme un défaut génétique. Pouvoir les sélectionner de manière programmée serait donc un avantage certain, et pour cela l'identification des gènes responsables (voire des mutations causales qui leurs sont associées) est indispensable. La finalité de ce travail sera la mise en place de programmes de sélection génétique permettant de déterminer l'existence des gènes responsable de ce phénotype dans les différents cheptels bovins. Cette sélection assistée, très reproductible serait un atout économique important le contexte actuel européen.

J'ai choisi de réaliser ma thèse au sein de l'UMR 1061 car le sujet qui m'était proposé par l'équipe du Pr Julien s'inscrivait dans une thématique beaucoup plus large bien étudiée à l'INRA, à savoir l'étude du muscle bovin.

Ce travail devait être réalisé en collaboration avec d'autres équipes de l'INRA, et notamment celle basée sur le site de Clermont-Ferrand, ce qui représentait un aspect du travail très enrichissant. Aussi l'INRA est une grande structure publique de recherche et de nombreux séminaires internes sont organisés régulièrement par les différentes équipes de département de génétique animale. Ceci facilite les prises de contact et les échanges scientifiques. Mais j'ajouterai que j'ai choisi de faire mon doctorat dans ce laboratoire, car la

thématique abordée me demandait l'apprentissage de nouvelles techniques de biologie. Toutes ces nouvelles compétences en biologie moléculaire que j'allai acquérir pendant ces quatre années de thèse me sont apparues comme nécessaires, indispensables et surtout un atout supplémentaire à ma formation initiale, en vue de mon projet professionnel.

Gestion du projet et moyens mis en œuvre

Cette thématique était déjà en place depuis un an au laboratoire quand je suis arrivée, et une étude bibliographique sur le sujet ainsi que la production d'outils biologiques avaient été réalisées par un étudiant de DEA. De nouveaux résultats scientifiques très importants sont apparus au cours de ma première année de doctorat et ont réorienté mon travail. Cette nouvelle réorientation a bien évidemment été décidée en accord avec les autres personnes directement impliquées dans la réalisation de mon projet de thèse, à savoir : le Professeur Raymond Julien, mon directeur de thèse, Hubert Levezièl, Directeur de Recherche à l'INRA, le Docteur Valérie Amarger et moi-même.

Ces trois personnes ont d'ailleurs toujours été concertées soit par le biais de réunions de travail programmées par l'équipe, soit de façon ponctuelle et informelle, quant aux décisions à prendre pour l'avancée de mes travaux. Ces réunions même si elles n'ont jamais été planifiées rigoureusement, ont toujours été un support indispensable pour gérer ce projet. Elles m'ont permis d'exposer de façon claire et concise mes derniers résultats tout en les replaçant dans leur contexte initial, d'être assidues dans mes recherches bibliographiques afin de pouvoir confronter les dernières parutions avec l'équipe, et enfin, de profiter de leur expérience de chercheur confirmé pour éviter les pertes de temps et les manipulations trop fastidieuses à mettre en place.

Des réunions internes au laboratoire ont aussi eu lieu pendant ces quatre années. En chaque début d'année toutes les équipes présentent leurs travaux aux autres membres du laboratoire et ainsi nous pouvons suivre et partager nos avancées scientifiques. Ces séminaires sont très enrichissants car ils m'ont permis de dialoguer avec des scientifiques qui, de part leur expérience, ont pu m'éclairer sur des techniques que je ne connaissais pas et surtout m'apporter des solutions aux problèmes que mon équipe et moi-même n'arrivions pas à résoudre. Ces réunions annuelles permettaient bien évidemment de mettre à jour les résultats et l'évolution du projet.

Quelques fois j'ai aussi dû provoquer des réunions afin de prouver à mon équipe l'intérêt que pouvait représenter ma participation à un colloque, voire même communiquer mes résultats. J'ai dû apprendre à gérer mon temps entre l'organisation du voyage, les dernières manipulations indispensables et les dates limites à respecter pour la demande d'inscription, l'envoi du résumé de mes travaux et enfin le diaporama de ma présentation.

Tout ceci m'a obligé à m'organiser, à tenir un calendrier précis quant aux différentes démarches suivies et à suivre.

Pour revenir à l'échelle du laboratoire, d'autres personnes m'ont été d'une aide indispensable. Les techniciens pour leur participation ponctuelle et les ingénieurs pour leur savoir-faire et leur disponibilité quant à l'utilisation de certains appareillages compliqués.

Beaucoup de personnes ont été mis à contribution pour mener à bien ce projet et le coût qu'il représente est assez conséquent.

Ressources humaines	Bourse et salaire	34500 €
	Encadrants	30000 €
	Permanents du laboratoire	10000€
	Administration	600 €
	Ecole doctorale	1650 €
	Sous-total	76750 €
Matériels	consommables	20000 €
	Equipement	15000 €
Infrastructures	Amortissements des locaux et aménagement	15000 €
	Frais d'entretien logistique et maintenance	5000 €
Documentation		500 €
déplacements		1500 €
Total		133750 €

Coût total de ma thèse : 133750 €

Compétences développées dans le cadre du projet

Au cours de ces quatre années de doctorat, j'ai développé des connaissances scientifiques théoriques et techniques, mais j'ai aussi appris à travailler en équipe au sein d'une institution hiérarchisée. Du point de vue scientifique il a fallu que je me familiarise rapidement avec toutes les données publiées sur le développement musculaire, sujet largement étudié depuis des dizaines d'années. J'ai dû étudier les particularités du génome bovin et apprendre à devenir autonome quant à l'utilisation des outils de biologie moléculaire et quant à la mise au point de certaines techniques utilisées en routine. Mais surtout, il a fallu que je me familiarise tout aussi rapidement avec les différents logiciels informatiques qui m'ont permis, dans un premier temps, d'orienter mon travail sur la base de simulations informatiques, et, dans un deuxième temps, d'analyser régulièrement mes résultats et de les comparer aux informations contenues dans les banques de données internationales. Ces analyses m'ayant permis par la suite et ceci tout au long de ma thèse de planifier mes manipulations futures en vue de la finalisation de mon projet de thèse.

L'acquisition de toutes ces connaissances fût l'objet d'un travail personnel rigoureux. Les difficultés techniques rencontrées au cours des quatre années m'ont appris à persévérer et à ne jamais me décourager.

Mes communications orales ou les posters présentés dans des congrès nationaux scientifiques et non scientifiques m'ont appris à gérer mon stress et à présenter mes travaux de façon didactique. La vulgarisation d'un exposé scientifique est un exercice difficile qu'il a fallu apprendre à maîtriser.

L'intégration dans une équipe de recherche est tout aussi riche d'expériences par les échanges de connaissances, de savoir et de savoir-faire. Mon envie de participer activement à cette dynamique scientifique et humaine m'a poussé à dépasser mes limites dans le sens où j'ai dû vaincre mon manque de confiance pour imposer mon point de vue et vendre mon projet. Cette capacité de persuasion a été indispensable pour négocier la faisabilité d'une manipulation ou encore l'achat d'un produit coûteux mais indispensable.

Mon adhésion à l'Association des Docteurs et Doctorants En Biologie de l'Université de Limoges (ADDEBUL) et ma participation active à l'organisation des journées nationales Biotechno 2001 et 2002, m'ont appris à m'organiser, à animer des réunions et à développer mes capacités relationnelles.

Evaluation des retombées de la thèse

Le bilan des ces quatre années est à la fois scientifique et personnel. D'une façon générale ce doctorat m'a fait découvrir une nouvelle thématique avec toute la curiosité que cela peut générer. Mais il m'a surtout permis de renforcer mes compétences techniques et ainsi d'acquérir une certaine autonomie vis-à-vis de la conduite de mon projet professionnel. Ce savoir faire technique me donne les capacités de mener un autre projet et je souhaiterai le mettre à profit en intégrant une nouvelle équipe.

La conduite du projet de ma thèse au sein du laboratoire de génétique animale de l'UMR 1061 m'a appris une certaine organisation du travail que je souhaiterai confronter à celle d'un autre laboratoire afin d'échanger et d'apprendre encore. Même si je considère que la thèse est une réelle expérience professionnelle, le fonctionnement d'un autre laboratoire avec tout ce que cela peut impliquer d'un point de vue relationnel et structural, me semble très intéressant à découvrir pour ma future intégration professionnelle.

Apprendre, échanger et travailler en équipe est vraiment un paramètre que je souhaite développer, et si possible à l'étranger pour découvrir un autre mode de fonctionnement imbriqué dans une culture différente.

Je ne sais pas encore si je souhaite réaliser cette expérience dans le secteur privé ou public mais je sais avec certitude que j'ai besoin d'ouvrir mon esprit et mes aptitudes relationnelles vers une autre structure professionnelle.

Références

bibliographiques

- Akai, J., Kimura, A. and Hata, R.I. (1999). Transcriptional regulation of the human type I collagen alpha2 (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats. **Gene**, 239: 65-73.
- Albano, R.M., Arkell, R., Beddington, R.S. and Smith, J.C. (1994). Expression of inhibin subunits and follistatin during postimplantation mouse development: decidual expression of activin and expression of follistatin in primitive streak, somites and hindbrain. **Development**, 120: 803-13.
- Alexandropoulos, K., Cheng, G. and Baltimore, D. (1995). Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92: 3110-4.
- Amthor, H., Christ, B., Rashid-Doubell, F., Kemp, C.F., Lang, E. and Patel, K. (2002). Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. **Dev Biol**, 243: 115-27.
- Amthor, H., Nicholas, G., McKinnell, I., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R. and Patel, K. (2004). Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. **Dev Biol**, 270: 19-30.
- Andersson, L. (2001). Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nat Rev Genet**, 2: 130-8.
- Andersson, L. and Georges, M. (2004). Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nat Rev Genet**, 5: 202-12.
- Artaza, J.N., Bhasin, S., Mallidis, C., Taylor, W., Ma, K. and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2002). Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. **J Cell Physiol**, 190: 170-9.
- Arthur, P.F. (1995). Double muscling in cattle: a review. **Aust J Agric Res**, 46: 1493-1515.
- Ashmore, C.R., Addis, P.B. and Doerr, L. (1973). Development of muscle fibers in the fetal pig. **J Anim Sci**, 36: 1088-93.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Cheifetz, S. and Massague, J. (1992). Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. **Cell**, 68: 97-108.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Montalvo, E. and Massague, J. (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. **Mol Cell Biol**, 16: 1066-73.
- Bacou, F. and Vigneron, P. (1976). Evolution périnatale des voies métaboliques glycolytiques et oxydatives de divers types de muscles squelettiques du lapin et du poulet. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, 16: 675-686.
- Bailey, A.J., Enser, M.B., Dransfield, E., Restall, D.J. and Avery, N.C. (1982). Muscle and adipose tissue from normal and double-muscled cattle: collagen types, muscle fiber diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties. Nijhoff Martinus, The Hague.
- Buckingham, M. (1992). Making muscle in mammals. **Trends Genet**, 8: 144-8.
- Buckingham, M. (2001). Skeletal muscle formation in vertebrates. **Curr Opin Genet Dev**, 11: 440-8.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D. and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **J Anat**, 202: 59-68.
- Campion, D.R. (1984). The muscle satellite cell: a review. **Int Rev Cytol**, 87: 225-51.

- Carlson, C.J., Booth, F.W. and Gordon, S.E. (1999). Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. **Am J Physiol**, 277: R601-6.
- Casas, E., Keele, J.W., Fahrenkrug, S.C., Smith, T.P., Cundiff, L.V. and Stone, R.T. (1999). Quantitative analysis of birth, weaning, and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreds segregating an inactive myostatin allele. **J Anim Sci**, 77: 1686-92.
- Charlier, C., Coppeters, W., Farnir, F., Grobet, L., Leroy, P.L., Michaux, C., Mni, M., Schwers, A., Vanmanshoven, P., Hanset, R. and et al. (1995). The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. **Mamm Genome**, 6: 788-92.
- Clinquart, A., Hornick, J.L., Van Eenaeme, C. and Istasse, L. (1998). Influence du caractère culard sur la production et la qualité de la viande des bovins Blanc Bleu Belge. **INRA Prod Anim**, 11: 285-297.
- Conlon, I. and Raff, M. (1999). Size control in animal development. **Cell**, 96: 235-44.
- Crisa, A., Marchitelli, C., Savarese, M.C. and Valentini, A. (2003). Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. **Cytogenet Genome Res**, 102: 48-52.
- de Groot, E., Veltmaat, J., Caricasole, A., Defize, L. and van den Eijnden-van Raaij, A. (2000). Cloning and analysis of the mouse follistatin promoter. **Mol Biol Rep**, 27: 129-39.
- de Lapeyrière, O., Ollendorff, V., Planche, J., Ott, M.O., Pizette, S., Coulier, F. and Birnbaum, D. (1993). Expression of the FGF-6 gene is restricted to developing skeletal muscle in the mouse embryo. **Dev.**, 118: 601-611.
- de Winter, J.P., ten Dijke, P., de Vries, C.J., van Achterberg, T.A., Sugino, H., de Waele, P., Huylebroeck, D., Verschueren, K. and van den Eijnden-van Raaij, A.J. (1996). Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. **Mol Cell Endocrinol**, 116: 105-14.
- Dodou, E., Xu, S.M. and Black, B.L. (2003). *mef2c* is activated directly by myogenic basic helix-loop-helix proteins during skeletal muscle development in vivo. **Mech Dev**, 120: 1021-32.
- Draeger, A., Weeds, A.G. and Fitzsimons, R.B. (1987). Primary, secondary and tertiary myotubes in developing skeletal muscle: a new approach to the analysis of human myogenesis. **J Neurol Sci**, 81: 19-43.
- Duan, L.J., Broomfield, J.A. and Drysdale, T.A. (2003). Expression of muscle LIM protein during early development in *Xenopus laevis*. **Int J Dev Biol**, 47: 299-302.
- Dufey, P.A. and Chambaz, A. (1999). Production de viande bovine sous label: réflexions sur la qualité. **Revue Suisse Agric.**, 31: 277-283.
- Duris, M.P., Renand, G. and Picard, B. (1999). Genetic variability of foetal bovine myoblasts in primary culture. **Histochem J**, 31: 753-60.
- Eloy-Trinquet, S. and Nicolas, J.F. (2002). Cell coherence during production of the presomitic mesoderm and somitogenesis in the mouse embryo. **Development**, 129: 3609-19.
- Ethier, J.F., Houde, A., Lussier, J.G. and Silversides, D.W. (1997). Bovine activin receptor type II cDNA: cloning and tissue expression. **Mol Cell Endocrinol**, 106: 1-8.
- Ferrell, R.E., Conte, V., Lawrence, E.C., Roth, S.M., Hagberg, J.M. and Hurley, B.F. (1999). Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. **Genomics**, 62: 203-7.
- Fiems, L.O., De Campeneere, S., Van Caelenbergh, W., De Boever, J.L. and Vanacker, J.M. (2002). Carcass and meat quality in double-muscléd Belgian Blue bulls and cows. **Meat Science**, 63: 345-352.

- Florini, J.R., Ewton, D.Z. and Coolican, S.A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocr Rev**, 17: 481-517.
- Florini, J.R., Ewton, D.Z. and Magri, K.A. (1991). Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. **Annu Rev Physiol**, 53: 201-16.
- Freking, B.A., Murphy, S.K., Wylie, A.A., Rhodes, S.J., Keele, J.W., Leymaster, K.A., Jirtle, R.L. and Smith, T.P. (2002). Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. **Genome Res**, 12: 1496-506.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J. and MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, 253: 448-51.
- Gagnière, H., Picard, B. and Geay, Y. (1999b). Contractile differentiation of foetal cattle muscles: intermuscular variability. **Reprod Nutr Dev**, 39: 637-55.
- Gagnière, H., Picard, B., Jurie, C. and Geay, Y. (1997). Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-muscled cattle. **Meat Science**, 45: 145-152.
- Gagnière, H., Picard, B., Jurie, C. and Geay, Y. (1999a). Comparison of foetal metabolic differentiation in three cattle muscles. **Reprod Nutr Dev**, 39: 105-12.
- Gamer, L.W., Cox, K.A., Small, C. and Rosen, V. (2001). Gdf11 is a negative regulator of chondrogenesis and myogenesis in the developing chick limb. **Dev Biol**, 229: 407-20.
- Gebhardt, F., Zanker, K.S. and Brandt, B. (1999). Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. **J Biol Chem**, 274: 13176-80.
- Georges, M., Charlier, C. and Cockett, N. (2003). The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. **Trends Genet**, 19: 248-52.
- Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., Nair, G., Arver, S. and Bhasin, S. (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95: 14938-43.
- Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Menissier, F., Massabanda, J., Fries, R., Hanset, R. and Georges, M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nat Genet**, 17: 71-4.
- Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Menissier, F., Zanotti, M., Dunner, S. and Georges, M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mamm Genome**, 9: 210-3.
- Guo, C.S., Degnin, C., Fiddler, T.A., Stauffer, D. and Thayer, M.J. (2003). Regulation of MyoD activity and muscle cell differentiation by MDM2, pRb, and Sp1. **J Biol Chem**, 278: 22615-22.
- Hale, C.S., Herring, W.O., Shibuya, H., Lucy, M.C., Lubahn, D.B., Keisler, D.H. and Johnson, G.S. (2000). Decreased growth in angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene. **J Anim Sci**, 78: 2099-104.
- Hannenhalli, S. and Levy, S. (2001). Promoter prediction in the human genome. **Bioinformatics**, 17 Suppl 1: S90-6.
- Hanset, R. (1992). L'hypertrophie musculaire en Blanc Bleu Belge. **Bull. G.T.V**, 5: 65-69.
- Hanset, R. and Ansey, M. (1972). Régions privilégiées d'hypertrophie musculaire chez le bovin culard. **Ann.Med.Vet.**, 116: 17-25.

- Hanset, R. and Michaux, C. (1985a). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in Belgian White and Blue cattle breed. **Gen. Sel. Evol.**, 17: 359-368.
- Hanset, R. and Michaux, C. (1985b). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in Belgian White and Blue cattle breed. **Gen. Sel. Evol.**, 17: 369-386.
- Haroon, Z.A., Amin, K., Lichtlen, P., Sato, B., Huynh, N.T., Wang, Z., Schaffner, W. and Murphy, B.J. (2004). Loss of metal transcription factor-1 suppresses tumor growth through enhanced matrix deposition. **Faseb J**, 18: 1176-84.
- Hashimoto, O., Nakamura, T., Shoji, H., Shimasaki, S., Hayashi, Y. and Sugino, H. (1997). A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. **J Biol Chem**, 272: 13835-42.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Melton, D. (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. **Cell**, 88: 13-7.
- Hilden, K., Tuuri, T., Eramaa, M. and Ritvos, O. (1994). Expression of type II activin receptor genes during differentiation of human K562 cells and cDNA cloning of the human type IIB activin receptor. **Blood**, 83: 2163-70.
- Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M. and Wolfman, N.M. (2003). Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. **Mol Endocrinol**, 17: 1144-54.
- Huang, T.S., Lee, C.C., Chang, A.C., Lin, S., Chao, C.C., Jou, Y.S., Chu, Y.W., Wu, C.W. and Whang-Peng, J. (2003). Shortening of microsatellite deoxy(CA) repeats involved in GL331-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9 gene expression. **Biochem Biophys Res Commun**, 300: 901-7.
- Hughes, S.M., Chi, M.M., Lowry, O.H. and Gundersen, K. (1999). Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. **J Cell Biol**, 145: 633-42.
- Hughes, S.M. and Salinas, P.C. (1999). Control of muscle fibre and motoneuron diversification. **Curr Opin Neurobiol**, 9: 54-64.
- Iezzi, S., Di Padova, M., Serra, C., Caretti, G., Simone, C., Maklan, E., Minetti, G., Zhao, P., Hoffman, E.P., Puri, P.L. and Sartorelli, V. (2004). Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. **Dev Cell**, 6: 673-84.
- Innis, C.A. and Hyvonen, M. (2003). Crystal structures of the heparan sulfate-binding domain of follistatin. Insights into ligand binding. **J Biol Chem**, 278: 39969-77.
- Inouye, S., Ling, N. and Shimasaki, S. (1992). Localization of the heparin binding site of follistatin. **Mol Cell Endocrinol**, 90: 1-6.
- Ishisaki, A., Yamato, K., Hashimoto, S., Nakao, A., Tamaki, K., Nonaka, K., ten Dijke, P., Sugino, H. and Nishihara, T. (1999). Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. **J Biol Chem**, 274: 13637-42.
- Iwahori, A., Fraidenraich, D. and Basilico, C. (2004). A conserved enhancer element that drives FGF4 gene expression in the embryonic myotomes is synergistically activated by GATA and bHLH proteins. **Dev Biol**, 270: 525-37.
- Jeanplong, F., Sharma, M., Somers, W.G., Bass, J.J. and Kambadur, R. (2001). Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. **Mol Cell Biochem**, 220: 31-7.
- Ji, S., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F. and Spurlock, M.E. (1998). Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. **Am J Physiol**, 275: R1265-73.

- Jiang, Y.L., Li, N., Du, L.X. and Wu, C.X. (2002). [Relationship of T-->A mutation in the promoter region of myostatin gene with growth traits in swine]. **Yi Chuan Xue Bao**, 29: 413-6.
- Johanson, M., Meents, H., Ragge, K., Buchberger, A., Arnold, H.H. and Sandmoller, A. (1999). Transcriptional activation of the myogenin gene by MEF2-mediated recruitment of myf5 is inhibited by adenovirus E1A protein. **Biochem Biophys Res Commun**, 265: 222-32.
- Jouliia, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B. and Cabello, G. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. **Exp Cell Res**, 286: 263-75.
- Kablar, B., Krastel, K., Tajbakhsh, S. and Rudnicki, M.A. (2003). Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. **Dev Biol**, 258: 307-18.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P. and Bass, J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscle Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Res**, 7: 910-6.
- Kenny-Mobbs, T. and Thorogood, P. (1987). Autonomy of differentiation in avian branchial somites and the influence of adjacent tissues. **Development**, 100: 449-62.
- Kirk, S., Oldham, J., Kambadur, R., Sharma, M., Dobbie, P. and Bass, J. (2000). Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. **J Cell Physiol**, 184: 356-63.
- Kocamis, H., Gahr, S.A., Batelli, L., Hubbs, A.F. and Killefer, J. (2002). IGF-I, IGF-II, and IGF-receptor-1 transcript and IGF-II protein expression in myostatin knockout mice tissues. **Muscle Nerve**, 26: 55-63.
- Kocamis, H. and Killefer, J. (2002). Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. **Domest Anim Endocrinol**, 23: 447-54.
- Kong, Y., Flick, M.J., Kudla, A.J. and Konieczny, S.F. (1997). Muscle LIM protein promotes myogenesis by enhancing the activity of MyoD. **Mol Cell Biol**, 17: 4750-60.
- Lee, S.J. and McPherron, A.C. (1999). Myostatin and the control of skeletal muscle mass. **Curr Opin Genet Dev**, 9: 604-7.
- Lee, S.J. and McPherron, A.C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98: 9306-11.
- Lefaucheur, L., Edom, F., Ecolan, P. and Butler-Browne, G.S. (1995). Pattern of muscle fiber type formation in the pig. **Dev Dyn**, 203: 27-41.
- Legerski, R., Zhou, X., Dresback, J., Eberspaecher, H., McKinney, S., Segarini, P. and de Crombrughe, B. (1992). Molecular cloning and characterization of a novel rat activin receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, 183: 672-9.
- Lin, J., Arnold, H.B., Della-Fera, M.A., Azain, M.J., Hartzell, D.L. and Baile, C.A. (2002). Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 291: 701-6.
- Majumder, S., Ghoshal, K., Summers, D., Bai, S., Datta, J. and Jacob, S.T. (2003). Chromium(VI) down-regulates heavy metal-induced metallothionein gene transcription by modifying transactivation potential of the key transcription factor, metal-responsive transcription factor 1. **J Biol Chem**, 278: 26216-26.
- Mangiacapra, F.J., Roof, S.L., Ewton, D.Z. and Florini, J.R. (1992). Paradoxical decrease in myf-5 messenger RNA levels during induction of myogenic differentiation by insulin-like growth factors. **Mol Endocrinol**, 6: 2038-44.
- Massague, J. and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. **Embo J**, 19: 1745-54.
- Mathews, L.S. and Vale, W.W. (1993). Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation. **J Biol Chem**, 268: 19013-8.

- Matzuk, M.M., Kumar, T.R., Vassalli, A., Bickenbach, J.R., Roop, D.R., Jaenisch, R. and Bradley, A. (1995). Functional analysis of activins during mammalian development. **Nature**, 374: 354-6.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M. and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, 387: 83-90.
- McPherron, A.C. and Lee, S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94: 12457-61.
- Ménissier, F. (1982). General survey of the effect of double muscling on cattle performance. **Current Topics Vet. Med. Ani. Sci**, 16: 23-53.
- Milan, D., Jeon, J.T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., Rogel-Gaillard, C., Paul, S., Iannuccelli, N., Rask, L., Ronne, H., Lundstrom, K., Reinsch, N., Gellin, J., Kalm, E., Roy, P.L., Chardon, P. and Andersson, L. (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. **Science**, 288: 1248-51.
- Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F. and Olson, E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. **Cell**, 83: 1125-36.
- Monin, G. (1991). Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine. **INRA Prod Anim**, 4: 151-160.
- Musaro, A., McCullagh, K.J., Naya, F.J., Olson, E.N. and Rosenthal, N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. **Nature**, 400: 581-5.
- Nakatani, M., Yamakawa, N., Matsuzaki, T., Shimasaki, S., Sugino, H. and Tsuchida, K. (2002). Genomic organization and promoter analysis of mouse follistatin-related gene (FLRG). **Mol Cell Endocrinol**, 189: 117-23.
- Nishi, M., Yasue, A., Nishimatu, S., Nohno, T., Yamaoka, T., Itakura, M., Moriyama, K., Ohuchi, H. and Noji, S. (2002). A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, 293: 247-51.
- Phillips, D.J., de Krester, D.M. and Padmanabhan, V. (2001). Follistatin: From Puberty to Menopause. In: Muttukrishna, S. and Ledger, W. (Eds.), *Inhibin, Activin and Follistatin in Human Reproductive Physiology*. Imperial College Press, London, pp. 331.
- Phillips, D.J. and de Kretser, D.M. (1998). Follistatin: a multifunctional regulatory protein. **Front Neuroendocrinol**, 19: 287-322.
- Picard, B., Depreux, F. and Geay, Y. (1998). Muscle differentiation of normal and double-muscled bovine foetal myoblasts in primary culture. **Basic Appl. Myol.**, 8: 197-203.
- Picard, B., Gagnière, H., Geay, Y., Hocquette, J.F. and Robelin, J. (1995a). Study of influence of age and weaning on the contractile and metabolic characteristics of bovine muscle. **Reprod Nutr Dev**, 35: 71-84.
- Picard, B., Gagnière, H., Robelin, J. and Geay, Y. (1995b). Comparison of the foetal development of muscle in normal and double-muscled cattle. **J Muscle Res Cell Motil**, 16: 629-39.
- Pierson, T.M. and Matzuk, M.M. (2001). Transgenic Mouse. In: Muttukrishna, S. and Ledger, W. (Eds.), *Inhibin, Activin and Follistatin in Human Reproductive Physiology*. Imperial College Press, London, pp. 331.
- Pirkanen, A., Kiefer, J.C. and Hauschka, S.D. (2000). IGFs, insulin, Shh, bFGF, and TGF-beta1 interact synergistically to promote somite myogenesis in vitro. **Dev Biol**, 224: 189-203.

- Pourquie, O., Fan, C.M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M. and Le Douarin, N.M. (1996). Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. **Cell**, *84*: 461-71.
- Puri, P.L. and Sartorelli, V. (2000). Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. **J Cell Physiol**, *185*: 155-73.
- Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J. and Attisano, L. (2003). Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. **Mol Cell Biol**, *23*: 7230-42.
- Renand, G., Larzul, C., Le Bihan-Duval, E. and Le Roy, P. (2003). L'amélioration génétique de la qualité de la viande dans les différentes espèces: situation actuelle et perspectives à court et moyen terme. **INRA Prod Anim**, *16*: 159-173.
- Roberts, S.B. and Goetz, F.W. (2001). Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. **FEBS Lett**, *491*: 212-6.
- Robertson, D.M., Klein, R., de Vos, F.L., McLachlan, R.I., Wettenhall, R.E., Hearn, M.T., Burger, H.G. and de Kretser, D.M. (1987). The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. **Biochem Biophys Res Commun**, *149*: 744-9.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V. and Bate, M. (2000). Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. **Cell**, *102*: 189-98.
- Sacks, L.D., Cann, G.M., Nikovits, W., Jr., Conlon, S., Espinoza, N.R. and Stockdale, F.E. (2003). Regulation of myosin expression during myotome formation. **Development**, *130*: 3391-402.
- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hubner, C., Riebel, T., Komen, W., Braun, T., Tobin, J.F. and Lee, S.J. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **N Engl J Med**, *350*: 2682-8.
- Semsarian, C., Sutrave, P., Richmond, D.R. and Graham, R.M. (1999). Insulin-like growth factor (IGF-I) induces myotube hypertrophy associated with an increase in anaerobic glycolysis in a clonal skeletal-muscle cell model. **Biochem J**, *339* (Pt 2): 443-51.
- Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J. and Bass, J.J. (1999). Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. **J Cell Physiol**, *180*: 1-9.
- Shi, Y. and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, *113*: 685-700.
- Sidis, Y., Schneyer, A.L., Sluss, P.M., Johnson, L.N. and Keutmann, H.T. (2001). Follistatin: essential role for the N-terminal domain in activin binding and neutralization. **J Biol Chem**, *276*: 17718-26.
- Smit, M., Segers, K., Carrascosa, L.G., Shay, T., Baraldi, F., Gyapay, G., Snowden, G., Georges, M., Cockett, N. and Charlier, C. (2003). Mosaicism of Solid Gold supports the causality of a noncoding A-to-G transition in the determinism of the callipyge phenotype. **Genetics**, *163*: 453-6.
- Smith, J.A., Lewis, A.M., Wiener, P. and Williams, J.L. (2000). Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. **Anim Genet**, *31*: 306-9.
- Smith, T.P.L., Thallman, R.M., Casas, E., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L. and Koohmaraie, M.: Theory and application of genome-based approaches to improve quality and value of beef. In: USDA (Ed.), INTERBEV, Paris, 2003.

- Sonstegard, T.S., Rohrer, G.A. and Smith, T.P. (1998). Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. **Anim Genet**, 29: 19-22.
- Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1991). The transforming growth factors beta. In: Sporn M.B., R.A.B. (Ed.), Peptide growth factors and their receptors, part I, New York: Springer-Verlag, pp. 419-472.
- Stern, H.M., Lin-Jones, J. and Hauschka, S.D. (1997). Synergistic interactions between bFGF and a TGF-beta family member may mediate myogenic signals from the neural tube. **Development**, 124: 3511-23.
- Stockdale, F.E. and Miller, J.B. (1987). The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. **Dev Biol**, 123: 1-9.
- Stratil, A. and Kopečný, M. (1999). Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. **Anim Genet**, 30: 468-70.
- Szabo, G., Dallmann, G., Muller, G., Patthy, L., Soller, M. and Varga, L. (1998). A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. **Mamm Genome**, 9: 671-2.
- Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (2000). The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. **Curr Top Dev Biol**, 48: 225-68.
- Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Jr., Kull, F.C., Jr. and Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 280: E221-8.
- Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A. and Wolfman, N.M. (2001). GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. **Growth Factors**, 18: 251-9.
- Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J. and Kambadur, R. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **J Biol Chem**, 275: 40235-43.
- Tortorella, L.L., Milasincic, D.J. and Pilch, P.F. (2001). Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. **J Biol Chem**, 276: 13709-17.
- Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S. and Guillemin, R. (1987). Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 84: 8282-6.
- Valdez, M.R., Richardson, J.A., Klein, W.H. and Olson, E.N. (2000). Failure of Myf5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD, and MRF4. **Dev Biol**, 219: 287-98.
- Van Laere, A.S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., Archibald, A.L., Haley, C.S., Buys, N., Tally, M., Andersson, G., Georges, M. and Andersson, L. (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. **Nature**, 425: 832-6.
- Venters, S.J., Argent, R.E., Deegan, F.M., Perez-Baron, G., Wong, T.S., Tidyman, W.E., Denetclaw, W.F., Jr., Marcelle, C., Bronner-Fraser, M. and Ordahl, C.P. (2004). Precocious terminal differentiation of premigratory limb muscle precursor cells requires positive signalling. **Dev Dyn**, 229: 591-9.
- Venters, S.J. and Ordahl, C.P. (2002). Persistent myogenic capacity of the dermomyotome dorsomedial lip and restriction of myogenic competence. **Development**, 129: 3873-85.
- Venters, S.J., Thorsteinsdottir, S. and Duxson, M.J. (1999). Early development of the myotome in the mouse. **Dev Dyn**, 216: 219-32.

- Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N. and Klein, W.H. (1995). Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. **J Cell Biol**, 128: 563-76.
- Wakelam, M.J.O. (1985). The fusion of myoblasts. **Biochem. J.**, 228: 1-12.
- Wang, D.Z., Valdez, M.R., McAnally, J., Richardson, J. and Olson, E.N. (2001). The Mef2c gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. **Development**, 128: 4623-33.
- Wang, Y., Wimmer, U., Lichtlen, P., Inderbitzin, D., Stieger, B., Meier, P.J., Hunziker, L., Stallmach, T., Forrer, R., Rulicke, T., Georgiev, O. and Schaffner, W. (2004). Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. **Faseb J**, 18: 1071-9.
- Wegner, J., Albrecht, I., Fiedler, I., Teuscher, F., Papstein, H.J. and Ender, K. (2000). Growth and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. **J Anim Sci**, 78: 1485-1496.
- Weyman, C.M. and Wolfman, A. (1998). Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) activity is required for inhibition of skeletal muscle differentiation by insulin-like growth factor 1 or fibroblast growth factor 2. **Endocrinology**, 139: 1794-800.
- Willis, S.A., Zimmerman, C.M., Li, L.I. and Mathews, L.S. (1996). Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. **Mol Endocrinol**, 10: 367-79.
- Wilson, S.J., McEwan, J.C., Sheard, P.W. and Harris, A.J. (1992). Early stages of myogenesis in a large mammal: formation of successive generations of myotubes in sheep tibialis cranialis muscle. **J Muscle Res Cell Motil**, 13: 534-50.
- Xu, L., Chen, Y.G. and Massague, J. (2000). The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. **Nat Cell Biol**, 2: 559-62.
- Yamanouchi, K., Soeta, C., Naito, K. and Tojo, H. (2000). Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. **Biochem Biophys Res Commun**, 270: 510-6.
- Zentella, A. and Massague, J. (1992). Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 89: 5176-80.
- Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J.G. and McNally, E.M. (2000). Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. **FEBS Lett**, 474: 71-5.
- Zimmerman, C.M. and Mathews, L.S. (2001). Activin Receptors And Their Mecanism of Action. In: Muttukrishna, S. and Ledger, W. (Eds.), *Inhibin, Activin and Follistatin in Human Reproductive Physiology*. Imperial College Press, London, pp. 331.
- Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M. and Lee, S.J. (2002). Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science**, 296: 1486-8.
- Zorzano, A., Kaliman, P., Guma, A. and Palacin, M. (2003). Intracellular signals involved in the effects of insulin-like growth factors and neuregulins on myofibre formation. **Cell Signal**, 15: 141-9.

Résumé

La croissance du muscle squelettique est un processus complexe, impliquant de nombreux facteurs moléculaires. La myostatine (GDF-8) est un puissant régulateur négatif du développement musculaire, et l'absence d'une protéine fonctionnelle provoque une incroyable augmentation de la masse musculaire, chez la souris et le bovin. Des mutations dans le gène codant la myostatine ont été associées à l'extrême musculature observée chez le bovin. Cependant, des individus présentant différents degrés d'hypertrophie musculaire ont également été observés, sans qu'aucune mutation identifiée dans le gène codant la myostatine ne soit responsable. Ces observations phénotypiques suggèrent l'implication d'autres mutations, qui pourraient modifier la fonctionnalité des partenaires de la voie de signalisation de la myostatine, et/ou l'implication d'un mécanisme de régulation quantitative, qui résulterait d'une modification de l'affinité de la myostatine avec ses partenaires.

Dans ce travail, nous avons étudié les gènes codant le récepteur de la myostatine, ActRIIB, et une protéine inhibitrice, la follistatine. Nous avons déterminé la structure bovine de ces deux gènes, et recherché d'éventuels polymorphismes chez des individus avec des degrés différents de développement musculaire. Aucun polymorphisme modifiant les séquences protéiques de ces deux gènes n'a été détecté. Une insertion/délétion de 6 pb et un SNP, détectés dans la région promotrice du gène *ACVR2B*, qui code pour le récepteur ActRIIB, semblent influencer l'activité transcriptionnelle de ce gène, *in vitro*. Un microsatellite polymorphe est présent dans la région promotrice du gène *FST* chez le bovin, la souris, l'homme et le rat, et pourrait modifier son expression. Ces résultats préliminaires, ouvrent de nouvelles perspectives d'étude sur l'influence possible de ces polymorphismes sur l'expression des gènes *ACVR2B* et *FST*, et par conséquent, sur la régulation de la voie de signalisation de la myostatine.

Abstract

Mutations in the myostatin gene are responsible for an increase in muscle mass in mouse and cattle. Myostatin is indeed a major regulator of muscle growth acting through a complex signalling pathway involving a large number of molecules. In several cattle breeds, individuals harboring different degrees of muscle hypertrophy are observed, independently of any mutation in the myostatin gene. The similarity between these phenotypes suggests that mutations affecting other members of the same signalling pathway might be involved. Moreover, the fact that different grades of the hypertrophy are observed from one animal to another suggests a quantitative regulation that could result from affinity changes in the binding of myostatin to its main partners. In this study, we investigate the possible involvement of the myostatin receptor, ActRIIB, and the myostatin inhibitor, follistatin. We have determined the structure of the bovine genes encoding these proteins and looked for polymorphisms between several individuals harboring various levels of muscular hypertrophy. No polymorphism affecting the protein sequences was identified. A 6bp insertion/deletion polymorphism and a SNP in the promoter region of the *ACVR2B* gene, encoding the ActRIIB receptor, appear to influence *in vitro* the transcription level of the gene. A polymorphic microsatellite is present in the promoter region of the *FST* gene in cattle, mouse, human and rat and might influence its expression although this was not demonstrated on the limited set of samples we investigated. This preliminary study opens the way to larger investigations on the possible influence of these polymorphisms on the expression of the *ACVR2B* and *FST* genes and the eventual consequences on the regulation of the myostatin signalling pathway.