

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Sciences – Technologie - Santé

## Faculté des Sciences et Techniques

Institut des Sciences de la vie et de la Santé  
Unité de Génétique Moléculaire Animale  
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n° 78-2006

## Thèse

pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Matthieu ROUX**

Le 19 Décembre 2006

Structure, expression et polymorphisme du gène *PRKAG3* bovin :  
implication dans le métabolisme musculaire  
et la qualité de la viande.

Directeurs de Thèse: Valérie Amarger & Hubert Levéziel

### JURY :

Rapporteurs :	Dr. Carole Charlier	PhD, Chercheur Qualifié, FNRS, Liège
	Dr. Denis Milan	Directeur de Recherche, INRA, Toulouse
Examineurs :	Dr. Ahmed Ouali	Directeur de Recherche, INRA, Clermont-Fd
	Pr. Véronique Blanquet	Professeur, Université de Limoges, Limoges
	Dr. Hubert Levéziel	Directeur de Recherche, INRA, Limoges
	Dr. Valérie Amarger	Chargé de Recherche, INRA, Nantes



# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Sciences – Technologie - Santé

## Faculté des Sciences et Techniques

Institut des Sciences de la vie et de la Santé  
Unité de Génétique Moléculaire Animale  
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse n° 78-2006

## Thèse

pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Matthieu ROUX**

Le 19 Décembre 2006

Structure, expression et polymorphisme du gène *PRKAG3* bovin :  
implication dans le métabolisme musculaire  
et la qualité de la viande.

Directeurs de Thèse: Valérie Amarger & Hubert Levéziel

### JURY :

Rapporteurs :	Dr. Carole Charlier	PhD, Chercheur Qualifié, FNRS, Liège
	Dr. Denis Milan	Directeur de Recherche, INRA, Toulouse
Examineurs :	Dr. Ahmed Ouali	Directeur de Recherche, INRA, Clermont-Fd
	Pr. Véronique Blanquet	Professeur, Université de Limoges, Limoges
	Dr. Hubert Levéziel	Directeur de Recherche, INRA, Limoges
	Dr. Valérie Amarger	Chargé de Recherche, INRA, Nantes



*Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : Madame Carole Charlier et Monsieur Denis Milan pour avoir accepté de juger mon travail, Madame Véronique Blanquet, Monsieur Ahmed Ouali, Monsieur Hubert Levéziel et Madame Valérie Amarger.*

*Je tiens à remercier le Département de Génétique Animale de l'INRA et le Conseil Régional pour leur soutien financier.*

*Je remercie également Monsieur Raymond Julien pour m'avoir accueilli lors de mon DEA, au sein de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale.*

*Je remercie Hubert Levéziel d'avoir bien voulu être le co-encadrant de cette thèse.*

*Merci beaucoup Valérie pour avoir encadré mon travail, pour tes précieux conseils, ta patience, ton enthousiasme et surtout pour la confiance que tu m'as accordé tout au long de ce travail. Je tiens aussi à te remercier pour ta grande disponibilité.*

*Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire qui m'ont soutenu au cours de ces années et qui ont contribué à l'avancée de ce travail par leurs savoirs, leurs idées et leur gentillesse.*

*Je remercie Daniel Petit sans qui je ne serais jamais venu à bout de ces analyses statistiques. Un grand merci Daniel !*

*Je remercie tous les thésards passés ou encore présents du laboratoire, pour l'apport de la bonne humeur et des pauses cafs que l'on s'est accordés au cours de ces années.*

*Je remercie plus particulièrement Arnaud, Floflo, Beubeu, Marie, Dédé, Fanny, Mag, Nico, Nath, Seb et Christelle pour les excellentes soirées et les très bons moments que nous avons passés ensemble.*

*Je ne pourrais terminer ces remerciements sans y associer mes parents pour leur soutien inconditionnel tout au long de ces années et pour leur confiance.*

*Enfin, je dédie ce travail à celle sans qui ce manuscrit n'existerait certainement pas, Aurélie. Merci de m'avoir accompagné et soutenu dans les bons et les mauvais moments de ma vie et donc de ma thèse.*

# *Sommaire*





<b>Sommaire.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>13</b>
<b>Table des illustrations.....</b>	<b>17</b>
<b>Publications et communications.....</b>	<b>21</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>23</b>
<b>Exposé Bibliographique.....</b>	<b>27</b>
<b>1. Le muscle squelettique.....</b>	<b>29</b>
1.1 Anatomie du muscle.....	29
1.1.1 Composition du muscle.....	29
1.1.2. Les filaments fins d'actine.....	31
1.1.3. Les filaments épais de myosine.....	31
1.1.4. Les phénomènes moléculaires de la contraction musculaire.....	33
1.1.5. Les fibres musculaires.....	33
1.2. Métabolisme musculaire.....	35
1.2.1. Les transporteurs de glucose.....	35
1.2.2. Le glycogène.....	38
1.2.3. Les lipides intramusculaires.....	39
1.2.3.1 Structure du gène <i>PPARG</i> .....	43
1.2.3.2. Distribution des transcrits du gène <i>PPARG</i> .....	43
1.2.3.3. Action de <i>PPAR<math>\gamma</math></i> .....	43
1.2.4. La protéine kinase AMP dépendante.....	45
1.2.4.1. Structure de l'AMPK.....	49
1.2.4.2. Régulation de l'AMPK.....	53
1.2.4.3. L'AICAR : un activateur de l'AMPK.....	54
1.2.4.4. Identification de la kinase en amont de l'AMPK.....	55
1.2.4.5. Régulation de l'activité de l'AMPK par le glycogène.....	56
1.3. Famille des gènes bovins de l'AMPK.....	57
<b>2. Transformation du muscle en viande.....</b>	<b>59</b>
2.1. Evolution post-mortem du muscle.....	59
2.2. Maturation de la viande.....	63
2.3. Qualité des viandes.....	64
2.3.1. Caractéristiques technologiques.....	64
2.3.1.1. Le pouvoir de rétention d'eau.....	64
2.3.1.2. Le pH.....	65
2.3.2. Caractéristiques organoleptiques.....	65
2.3.2.1 Couleur.....	67
2.3.2.2. Tendreté.....	68
2.3.2.3. Jutosité.....	69
2.3.2.4. Flaveur.....	69
2.3.3. Qualité hygiénique.....	70
2.4. Gènes à effets majeurs sur la qualité de la viande.....	71

<b>Matériels &amp; Méthodes.....</b>	<b>75</b>
<b>1. Matériel biologique.....</b>	<b>77</b>
1.1. ADN génomique .....	77
1.2. Tissus .....	77
1.3. Anticorps .....	77
1.4. Lignées cellulaires.....	78
1.5. Vecteurs .....	78
<b>2. Méthodes relatives aux acides nucléiques .....</b>	<b>79</b>
2.1. Préparation d'ADN plasmidique.....	79
2.1.1. Mini-préparation et midi-préparation d'ADN plasmidique .....	79
2.1.2. Midi-préparation d'ADN de BAC .....	79
2.2. Préparation d'ADN .....	79
2.2.1. Extraction d'ADN génomique total à partir de muscle.....	79
2.3. Préparation d'ARN totaux .....	80
2.4. Méthodes basées sur la réaction en chaîne de polymérisation (PCR).....	80
2.4.1. Réaction de PCR (classique, Touchdown).....	80
2.4.2. RT-PCR.....	81
2.4.3. RACE-PCR (Rapid Amplification cDNA End's-PCR) .....	81
2.4.4. PCR quantitative .....	82
2.4.4.1. Quantification par chimie Taqman .....	82
2.4.4.2. Quantification par SYBR Green .....	82
2.5. Electrophorèse d'acides nucléiques et purification.....	83
2.5.1. Electrophorèse en gel d'agarose .....	83
2.5.2. Purification des fragments d'ADN après séparation sur gel d'agarose .....	83
2.6. Clonage de fragments d'ADN.....	83
2.6.1. Ligation .....	84
2.6.1.1. Ligation par Topoisomérase.....	84
2.6.1.2. Ligation des extrémités générées après digestion par des enzymes de restriction....	84
2.6.2. Préparation de bactéries compétentes .....	84
2.6.3. Transformation bactérienne .....	85
2.7. Séquençage.....	85
2.7.1. Séquençage selon la méthode de Sanger.....	85
2.7.2. Séquençage direct sur BAC .....	86
2.8. Recherche de polymorphismes de type SNP par la technique SSCP .....	86
2.8.1. Préparation des échantillons et des standards. ....	86
2.8.2. Electrophorèse et coloration au nitrate d'argent .....	86
2.9. Génotypage de SNP .....	87
2.9.1. Méthode Taqman® .....	87
2.9.2. Méthode Amplifluor .....	87
2.9.3. Méthode par longueur de fragment .....	88
<b>3. Méthodes relatives aux protéines.....</b>	<b>89</b>
3.1. Préparation des échantillons protéiques .....	89
3.2. Dosage des protéines.....	89
3.3. Analyse des protéines en gel de polyacrylamide .....	89
3.4. Immunodétection des protéines par transfert actif sur membrane de nitrocellulose.....	89

3.5. Tests d'activité .....	90
3.6. Immunoprécipitation .....	91
<b>4. Méthodes relatives aux cellules .....</b>	<b>92</b>
4.1. Transfections transitoires .....	92
4.2. Expression bactérienne .....	92
4.3. Production in-vitro .....	92
<b>Résultats .....</b>	<b>95</b>
<b>1. Le gène <i>PRKAG3</i> bovin .....</b>	<b>99</b>
Résultats .....	99
1.1. Structure du gène <i>PRKAG3</i> bovin et recherche de polymorphismes.....	99
1.2. Analyse des transcrits du gène <i>PRKAG3</i> bovin .....	102
1.3. Etude de la région promotrice du gène <i>PRKAG3</i> .....	103
1.4. Analyse quantitative du taux de transcrits <i>PRKAG3</i> .....	103
1.5. Génotypage des polymorphismes et étude d'association.....	107
1.6. Génotypage de la région promotrice.....	117
1.7. Génotypage de plusieurs races pour une étude haplotypique.....	117
<b>2. Etude fonctionnelle de la protéine codée par le gène <i>PRKAG3</i>.....</b>	<b>121</b>
2.1. Introduction.....	121
2.2. Résultats .....	121
<b>3. Les autres gènes de la famille AMPK bovine .....</b>	<b>131</b>
3.1 Introduction.....	131
3.2. Résultats .....	131
3.2.1. Identification des différents gènes bovins de l'AMPK.....	131
3.2.2. Quantifications des transcrits des différents gènes chez le bovin.....	133
<b>4. Etude du gène <i>PPARG</i> bovin et mise en évidence de transcrits chimères .....</b>	<b>135</b>
4.1. Introduction.....	135
4.2. Résultats .....	135
<b>Discussion .....</b>	<b>139</b>
Le gène <i>PRKAG3</i> bovin est le siège d'une exceptionnelle variabilité.....	141
Une étude préliminaire montre une association entre un polymorphisme du gène et le taux de glycogène musculaire.....	145
La sous-unité $\gamma_3$ de l'AMPK n'a pas pu être produite in vitro en système procaryote ou eucaryote.....	146
Les différentes sous-unités bovines de l'AMPK ont été caractérisées et quantifiées.....	148
L'étude du gène <i>PPARG</i> bovin a révélé la présence d'épissages intergéniques chez le bovin. ..	148
<b>Conclusion – Perspectives.....</b>	<b>151</b>
<b>Nouveau Chapitre de Thèse Valorisation des compétences .....</b>	<b>157</b>

1. Cadre général, enjeux et présentation. ....	159
2. Déroulement, gestion de projet et moyens mis en œuvre. ....	160
3. Compétences développées dans le cadre du projet. ....	162
4. Résultats, impact de la thèse. ....	164

<b>Annexes.....</b>	<b>167</b>
---------------------	------------

<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>18181</b>
---	--------------

# *Liste des abréviations*



ACC : Acetyl CoA Carboxylase  
 ADD-1 : Adducin-1  
 AICAR : 5-AminoImidazole-4-CarboxAmide 1- $\beta$ -D-Ribofuranoside  
 AMP : Adénosine Mono-Phosphate  
 AMPK: AMP-Activated Protein Kinase  
 AMPKK : AMP-Activated Protein Kinase Kinase  
 ANOVA : Analysis Of Variance  
 ASC : Association with SNF1 Complex  
 ATP : Adénosine Tri-Phosphate  
 BAC : Bacterial Artificial Chromosome  
 CaMKK : Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase  
 CBS : Cystathinine-  $\beta$ -Synthase  
 CEBP : CCAATT Enhancer Binding Proteins  
 CP : Creatine Phosphate  
 CS : Citrate Synthase  
 DFD : Dark, Firm and Dry  
 DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
 DTT : 1,4-Dithiothreitol  
 EDL : Extensor Digitorum Longus  
 EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétracétique  
 GBD : Glycogen Binding Domain  
 GLUT 1 : Glucose Transporter 1  
 GLUT 4 : Glucose Transporter 4  
 GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase-3  
 HKII : Hexokinase II  
 HMG- CoA Reductase : 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Reductase  
 HSP70 : 70 kilodalton Heat Shock Protein  
 IGF2 : Insulin-like Growth Factors II  
 IMPDH : Inosine Mono-Phosphate Dehydrogenase  
 IPTG : Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside  
 KIS : Kinase Interacting Sequence  
 LDH: Lactate Déshydrogénase  
 LINE : Long Inserted Element  
 LKB1 : Serine/Threonine Protein Kinase 11, STK 11  
 LRCE : Long Range Control Element  
 LT : *Longissimus thoracis*  
 Milieu LB : Milieu Luria-Bertani  
 MyHC: Myosin Heavy Chain  
 NMD : Non-sense Mediated mRNA Decay  
 PG : Potentiel Glycolytique  
 pHu : pH ultime  
 PI-3 kinase : Phosphatidylinositol 3-kinase  
 PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptors  
 PRKAA1 : Protein Kinase AMP-activated Alpha 1  
 PRKAA2 : Protein Kinase AMP-activated Alpha 2  
 PRKAB1 : Protein Kinase AMP-activated Beta 1  
 PRKAB2 : Protein Kinase AMP-activated Beta 2  
 PRKAG1 : Protein Kinase AMP-activated Gamma 1  
 PRKAG2 : Protein Kinase AMP-activated Gamma 2  
 PRKAG3 : Protein Kinase AMP-activated Gamma 3

PSE : Pale, Soft and Exudative  
RA : *Rectus abdominis*  
RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA-Ends by Polymerase Chain Reaction  
RN : Rendement Napole  
RT-PCR : Real-Time Polymerase Chain Reaction  
RTS : Rapid Translation System  
RXR : Retinoid X Receptor  
SDS : Sodium Dodecyl Sulphate  
SDS-PAGE : SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
SNF1 : SNF1 AMP-activated serine/threonine protein kinase  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism  
SREBP-1 : Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1  
SSCP : Single-Stranded Conformation Polymorphism  
ST : *Semitendinosus*  
STRAD : STE20-Related Adaptor protein  
SVF : Sérum de Veau Foetal  
TB : *Triceps brachii*  
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine  
TLR4 : Toll-Like Receptor 4  
TN : Troponine  
TOR : Target Of Rapamycin  
TSEN2 : tRNA Splicing Endonuclease 2  
UTR : Untranslated Region  
WPW : Wolff-Parkinson-White syndrome  
ZMP : 5-AminoImidazole-4-CarboxAmide 1-β-D-Riboside Monophosphate



# Table des illustrations

Figure 1 : Structure du muscle squelettique	30
Figure 2 : Structure d'un sarcomère	32
Figure 3 : Schéma d'absorption du glucose par la cellule	36
Figure 4 : Structure schématique du gène <i>PPARG</i>	42
Figure 5 : Contrôle moléculaire de l'adipogénèse	44
Figure 6 : Voie alternative de translocation de GLUT4	46
Figure 7 : Changements métaboliques induits par l'AMPK	47
Figure 8 : Modèle de structure de l'AMP kinase	48
Figure 9 : Structure cristallographique d'un domaine Bateman	50
Figure 10 : Mécanismes de régulation de l'AMPK	52
Figure 11 : Schéma d'acidification du muscle après abattage	60
Figure 12 : Relations entre les caractéristiques musculaires et les critères de qualité de la viande	62
Figure 13 : Couleur de la viande	66
Figure 14 : Représentation schématiques des sous-unités $\gamma$ de l'AMPK avec leurs quatre domaines CBS	72
Figure 15 : Structure du gène <i>PRKAG3</i>	100
Figure 16 : Représentation hypothétique du promoteur <i>PRKAG3</i>	104
Figure 17 : Résultats de quantification des transcrits <i>PRKAG3</i> totaux réalisés sur 9 animaux Limousin et 7 Charolais	105
Figure 18 : Position des 12 SNPs génotypés sur les veaux Holstein	106
Figure 19 : Analyse de variance entre les valeurs de glycogène et les polymorphismes en position 2343, 2643, 3451 et 3869 sur le gène <i>PRKAG3</i>	110
Figure 20 : Classification hiérarchique des SNPs du gène <i>PRKAG3</i> selon le coefficient de Spearman d'après le génotypage de la population Holstein	114
Figure 21 : Génotypage par la méthode d'analyse de fragment	116
Figure 22 : Représentation de la relation entre les différents haplotypes	118
Figure 23 : Localisation tissulaire de la protéine $\gamma_3$ par Western blot	120
Figure 24 : Production de la protéine $\gamma_3$ en système RTS	122
Figure 25 : Stratégie de clonage des 3 sous-unités de l'AMPK pour l'expression par la bactérie	124
Figure 26 : Production de la sous-unité $\gamma_3$ de l'AMPK par transfection de cellules HEK 293	128
Figure 27 : Résultats de quantification des différents gènes de l'AMPK dans différents tissus	132
Figure 28 : Clonage du transcrit chimère	136
Figure 29 : Western blot sur la protéine <i>PPARG</i>	136



## **Structure, expression et polymorphisme du gène *PRKAG3* bovin : implication dans le métabolisme musculaire et la qualité de la viande.**

Le gène *PRKAG3* code l'isoforme  $\gamma_3$  d'une sous-unité régulatrice de l'enzyme AMPK (AMP dependant Protein Kinase), cette kinase étant l'un des principaux médiateurs de la régulation du métabolisme des sucres et acides gras dans le muscle. Le gène *PRKAG3* bovin a été entièrement séquencé et sa structure établie. Nous avons mis en évidence une très grande variabilité au niveau de la séquence du gène et de la population de transcrits. 46 polymorphismes de type SNPs ont été identifiés, six d'entre eux entraînent un changement dans la séquence protéique. L'analyse des transcrits a montré l'existence de transcrits alternatifs générés par des mécanismes d'épissage jamais observés chez le porc ou dans d'autres espèces. Ces transcrits, correspondant à des formes plus longues de l'ARNm, sont retrouvés chez tous les animaux et présentent un taux de transcription plus faible que les transcrits standards de ce gène. Une étude préliminaire visant à explorer la variabilité phénotypique des caractéristiques des viandes en comparaison avec le génotype des animaux a montré que l'un des polymorphismes serait associé statistiquement avec le taux de glycogène. Nous avons également pu mettre en évidence que l'un des polymorphismes du gène *PRKAG3* est associé à une augmentation du taux de transcrits, suggérant une régulation de la transcription différente en fonction des allèles. Les 6 autres gènes codant les différentes isoformes des différentes sous-unités du complexe enzymatique ont également été caractérisés et leur polymorphisme étudié. Un taux beaucoup plus faible de polymorphisme a été détecté sur ces autres gènes, comparativement au nombre observé pour le gène *PRKAG3*. Une analyse quantitative des transcrits des différents gènes codant pour toutes les sous-unités de l'AMPK a été réalisée. Celle-ci nous a permis de confirmer que le transcrit du gène *PRKAG3* est préférentiellement exprimé dans le muscle squelettique, l'expression des transcrits des autres gènes étant plus ubiquitaire. La qualité d'une viande est également due à une composante lipidique dans le muscle. L'étude des transcrits du gène *PPARG* bovin a révélé l'existence d'un mécanisme complexe d'épissage intergénique, en plus des mécanismes habituels. Celui-ci conduit à deux types de transcrits chimères entre le gène *PPARG* et le gène voisin *TSEN2*. La présence d'une protéine chimère n'a pu être mise en évidence dans les tissus bovins, cependant cette protéine a pu être produite par expression transitoire dans des cellules de mammifère.

Mots clés : AMPK, *PRKAG3*, glycogène, muscle, *PPARG*, épissages intergéniques.

## **Structure, expression and polymorphism of the bovine *PRKAG3* gene: implication in muscular metabolism and meat quality.**

The *PRKAG3* gene encodes the  $\gamma_3$  isoform of a regulating sub-unit of AMPK (AMP dependent Protein Kinase) enzyme, this kinase is one of the principal mediators of the metabolism regulation of sugars and fatty acids in muscle. The bovine *PRKAG3* gene was entirely sequenced and its structure established. We have identified an important variability in this gene, 46 SNPs polymorphisms were identified and six of them result in a change in the amino-acid sequence. We demonstrated the existence of alternative transcripts resulting from splicing mechanisms never observed in the pig or in other species. These longer transcripts are found in all the animals, and show a transcription rate weaker than standard ones of this gene. A preliminary association study between the phenotypic characteristics of meat and the animals' genotype showed that one of these polymorphisms is statistically associated with the glycogen content. We could also highlight that one of the *PRKAG3* gene polymorphisms is associated with an increase in the expression level, suggesting a transcription regulation that might differ from one allele to another. The six other genes encoding the different sub-units isoforms of the AMPK complex were also characterized and screened for polymorphism. A lower level of polymorphism was detected in these genes, compared to the *PRKAG3* gene. Quantitative analysis of all AMPK bovine transcripts showed that *PRKAG3* is preferentially expressed in skeletal muscle whereas the other genes have an ubiquitous expression. Meat quality is also due to lipidic composition in muscle. The analysis of bovine *PPARG* transcripts have revealed, in addition to normal transcripts, a complex intergenic splicing mechanism, leading to two chimeric transcripts involving the *PPARG* gene and the neighbouring gene *TSEN2*. The putative chimeric protein could not be detected in bovine tissues, however this protein was transitory expressed in mammalian cells.

Key words: AMPK, *PRKAG3*, glycogen, muscle, *PPARG*, intergenic splicing.

# *Publications et communications*

**M. Roux**, A. Nizou, L. Forestier, A. Ouali, H. Leveziel and V. Amarger. (2006) Characterization of the bovine *PRKAG3* gene: structure, polymorphism, and alternative transcripts. *Mamm Genome* **17**(1): 83-92.

**M. Roux**, H. Leveziel and V. Amarger. (2006) Cotranscription and intergenic splicing of the *PPARG* and *TSEN2* genes in bovine. *BMC Genomics* **7**: 71.

**M. Roux**. Structure, expression et polymorphisme du gène *PRKAG3* : Application dans le métabolisme musculaire et la qualité de la viande. 6<sup>ème</sup> Séminaire des Thésards INRA, Département de Génétique Animale, Tours, France, 27-28 Mai 2004. [Communication Orale]

**M. Roux**, O. Chantreau, A. Ouali, H. Levéziel and V. Amarger. Molecular structure and polymorphisms of the *PRKAG3* gene in cattle. 5<sup>th</sup> Polish-French Symposium, Animal Growth and Development: Regulatory Mechanisms, Paris, France, September 22-23, 2004. [Communication orale]

**M. Roux**. Structure, expression et polymorphisme du gène *PRKAG3* : Application dans le métabolisme musculaire et la qualité de la viande. 7<sup>ème</sup> Séminaire des Thésards INRA, Département de Génétique Animale, Toulouse, France, 19-20 Mai 2005. [Communication Orale]

**E. Ciani**, **M. Roux**, R. Ciampolini, E. Mazzanti, F. Cecchi, H. Leveziel, S. Presciuttini and V. Amarger. Sequence variation of the *PRKAG3* gene in two cattle breeds: a phylogenetic analysis. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP), Uppsala, Sweden, June 5-8, 2005. [Poster]

**M. Roux**, E. Ciani, D. Petit, A. Ouali, R. Ciampolini, H. Leveziel and V. Amarger. Expression of *PRKAG3* gene and possible association with glycogen content in cattle. 30<sup>th</sup> International Conference on International Society of Animal Genetics (ISAG), Porto Seguro, Brazil, August 20-25, 2006. [Poster]



# *Introduction*





Pendant des milliers d'années, depuis la domestication des aurochs, et sans rien connaître de la génétique, les éleveurs ont observé que certaines caractéristiques animales se transmettent, observations dont ils se sont servis. Les animaux utilisés pour la reproduction ont été choisis parmi ceux présentant les meilleures performances pour des caractères jugés favorables. La nature de ces caractères a évolué au fil du temps et des exigences des hommes et varie également d'un pays à l'autre. 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. C'est à force d'expériences de croisements que des millénaires d'élevage ont créé de nouvelles races. Certains phénotypes ont alors été fortement sélectionnés et sont devenus majoritaires dans certaines populations. En effet, sous l'effet de la sélection, il y a eu une accumulation de mutations responsables de caractères jugés bénéfiques dont la plupart ont un déterminisme génétique complexe et souvent une composante environnementale. L'identification de ces mutations et de leur mécanisme d'action est et sera incontestablement très importante dans la compréhension des phénomènes physiologiques régissant les caractères phénotypiques complexes (Andersson et Georges, 2004).

La principale caractéristique recherchée n'a pas forcément été la couleur, mais plutôt la robustesse, la docilité, la fertilité et la quantité de lait. A partir du milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, les traits distinctifs des animaux (taille adulte, production de lait, poids...) commencèrent à être répertoriés. Dans le cas des bovins utilisés pour la production de viande, s'ajoute les caractères de croissance et de qualité de la viande au sens large. Ce dernier caractère est particulièrement complexe puisqu'il fait intervenir à la fois une composante structurale et une composante métabolique, dépendantes du patrimoine génétique mais aussi de l'environnement. Les exigences des consommateurs évoluent vers l'envie d'une viande de meilleure qualité : qualités nutritionnelles, sanitaires et organoleptiques. Les processus de traçabilité mis en place après la crise de la vache folle permettent un suivi sanitaire, cependant l'amélioration des qualités nutritionnelles et organoleptiques est encore mal maîtrisée.

De nombreux caractères d'intérêt économique chez les animaux d'élevage sont des caractères complexes, le plus souvent de type quantitatif pour lesquels plusieurs gènes sont vraisemblablement impliqués. Cependant, depuis quelques années, il est apparu que certains caractères quantitatifs dans certaines populations pouvaient être sous la dépendance d'un seul gène majeur expliquant tout ou partie de la variabilité observée. Un phénomène d'hypertrophie musculaire, le phénotype callipyge chez le mouton, est causé par une mutation dans la région LRCE (Long Range Control Element) qui joue un rôle important dans la régulation de certains gènes situés dans son voisinage (Freking *et al.*,

2002 ; Smit *et al.*, 2003). Chez le porc, une mutation ponctuelle, affectant le site de fixation d'un facteur de transcription régulant l'expression du gène *IGF2* dans le muscle, a pour conséquence une augmentation de la masse musculaire et une diminution de la masse grasseuse (Van Laere *et al.*, 2003). Plusieurs mutations sur le gène de la myostatine sont responsables de l'hypertrophie musculaire observée dans certaines races bovines (Blanc-Bleu Belge, Charolais et Piemontaise) (Grobet *et al.*, 1997). Ce même caractère d'hyper-musculature, lié à une mutation dans le gène de la myostatine, est également retrouvé chez le mouton Texel (Clop *et al.*, 2006). Ceci montre que des caractères quantitatifs touchant plusieurs espèces ont pour origine des effets génétiques similaires. Milan *et al.* (2000) ont montré qu'une mutation sur le gène *PRKAG3* se traduisait par une augmentation du taux de glycogène intra musculaire associé à une perte en eau lors de la transformation de la viande en jambon. Ce gène code l'isoforme  $\gamma_3$  d'une sous-unité régulatrice de l'enzyme AMPK (AMP dependant Protein Kinase), cette kinase étant l'un des principaux médiateurs de la régulation du métabolisme des sucres et acides gras dans le muscle. L'aspect d'une viande, sa valeur nutritive et son goût sont directement liés au métabolisme des sucres et des graisses dans le muscle. La concentration en glycogène musculaire au moment de l'abattage est un des facteurs les plus importants dans la qualité de la viande bovine, des taux insuffisants pouvant s'avérer responsables d'un pH trop élevé et d'une viande impropre à la consommation. Nous avons donc émis l'hypothèse que le gène *PRKAG3* bovin pouvait jouer un rôle dans le métabolisme musculaire chez le bovin et influencer la qualité de la viande qui est une exigence importante de la part des consommateurs.

Mon projet de thèse s'inscrit à la fois dans une démarche fondamentale et appliquée. La démarche fondamentale consiste en l'étude de la structure et de l'expression du gène codant la sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK. La démarche plus appliquée consiste en l'étude des polymorphismes du gène dans le but d'établir une liaison entre une mutation particulière et un phénotype d'intérêt. Ces deux démarches convergent vers la même finalité : comprendre et expliquer la grande variabilité de la qualité des viandes chez le bovin.

Le premier chapitre de ce mémoire, l'exposé bibliographique, est découpé en deux parties : la première concerne les caractéristiques du muscle et son métabolisme, la seconde concerne la transformation du muscle, les caractéristiques des viandes et l'influence génétique sur leurs qualités. Les différentes techniques utilisées au cours de cette thèse sont décrites dans un second chapitre. Enfin, les résultats de mon travail de thèse sont présentés sous la forme de 2 articles auxquels sont annexés des résultats complémentaires. Ces derniers sont discutés et mis en perspectives dans un dernier chapitre.

# *Exposé Bibliographique*



## 1. Le muscle squelettique

Les muscles sont les principaux organes chargés du mouvement chez les animaux. La viande est le résultat de la transformation *post mortem* du muscle des animaux d'élevage. Afin de mieux comprendre les caractéristiques des viandes il semble nécessaire de connaître la composition du muscle.

L'origine évolutive est très ancienne puisqu'on retrouve des cellules musculaires chez les coelentérés. Il existe plusieurs types de muscles ayant des fonctions différentes. Ainsi on distingue les muscles striés des muscles lisses dont l'organisation ultrastructurale est assez différente. Les muscles striés se subdivisent eux-mêmes en muscle squelettique et muscle cardiaque. Dans cet exposé, seules les caractéristiques du muscle squelettique seront abordées.

### 1.1 Anatomie du muscle.

#### 1.1.1 Composition du muscle.

Pour l'ensemble des mammifères, la composition et la structure des muscles squelettiques sont sensiblement identiques. Le muscle squelettique est quantitativement le muscle le plus important de l'organisme. Ce tissu représente jusqu'à 60% du poids de la carcasse. Le muscle squelettique est majoritairement composé d'eau et de protéines, les teneurs en lipides et en glucides étant faibles (Tableau 1). (Lebret *et al.*, 1999 ; Hocquette *et al.*, 2000).

Tableau 1: Composition du muscle squelettique.

<i>Composition</i>	<i>Quantité (%)</i>
<i>Eau</i>	<i>75 - 80 %</i>
<i>Protéines</i>	<i>15 -20 %</i>
<i>Glucides</i>	<i>1 - 2 %</i>
<i>Lipides</i>	<i>1 - 5 %</i>

Sur le plan structural, le muscle est un tissu composite qui renferme, outre les fibres musculaires, des tissus conjonctifs, adipeux, vasculaires et nerveux. Les vaisseaux sanguins, les nerfs et les cellules adipeuses intramusculaires sont localisés au niveau de la trame conjonctive, autour des faisceaux et des fibres musculaires. Chaque fibre est formée de la fusion de plusieurs centaines de cellules appelées myoblastes. Ce sont des cellules cylindriques allongées,

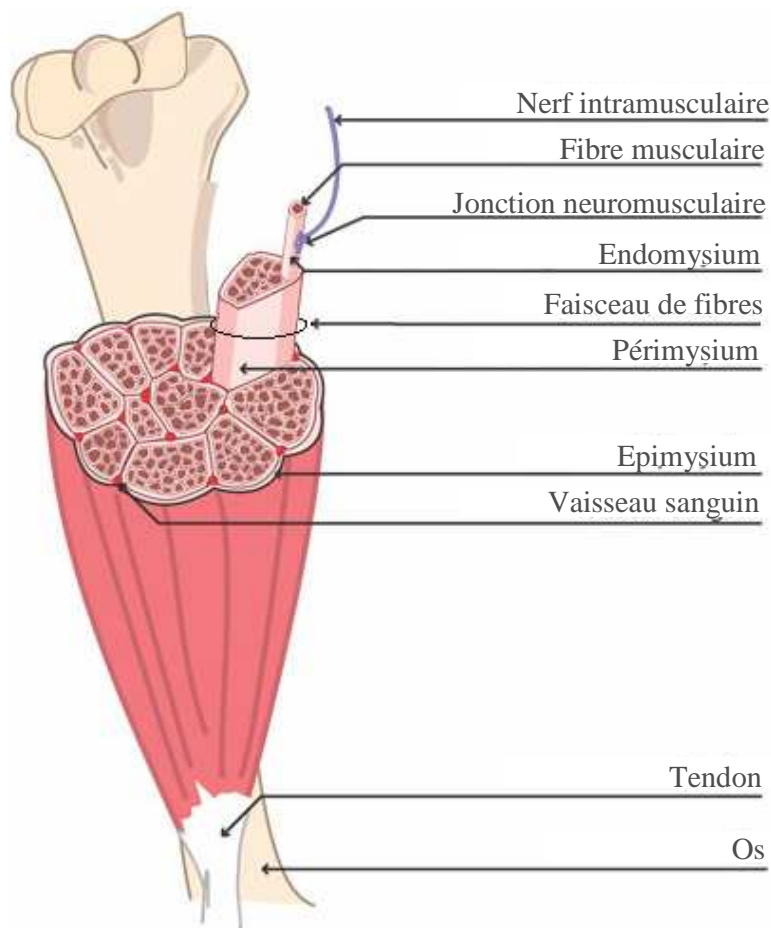


Figure 1 : Structure du muscle squelettique.

L'enveloppe qui soutient et protège le tissu musculaire est formée par du tissu conjonctif dense irrégulier ceci parce que les fibres de collagène et d'élastine fabriquées par les fibroblastes s'allongent toutes dans le sens de la longueur du muscle. Ce tissu conjonctif pénètre à l'intérieur du muscle et le divise en section (faisceau). Les vaisseaux sanguins qui alimentent le muscle circulent dans cette enveloppe fibreuse. L'enveloppe de tissu conjonctif dense se poursuit vers les extrémités du muscle. Aux extrémités, il ne reste plus de tissu musculaire mais seulement un cordon de tissu conjonctif dense, régulier qui forme alors le tendon, la structure qui attache le muscle à l'os.

plurinucléées, dont les noyaux sont accolés à la membrane plasmique (sarcolemme), ne nuisant pas aux éléments contractiles. Chaque fibre musculaire est formée de myofibrilles, elles-mêmes constituées de structures contractiles (Figure 1).

Plusieurs couches de tissus conjonctifs séparent et protègent les composantes des muscles squelettiques. L'endomysium sépare chaque fibre musculaire, le pérимыsium organise de 10 à 100 fibres musculaires en faisceaux et l'épimysium est la couche extérieure qui enveloppe tout le muscle. Le sarcolemme est la membrane qui entoure la fibre musculaire. Les fibres musculaires se terminent à leurs extrémités par des filaments de collagène, qui, regroupés, forment les tendons et assurent la fixation du muscle sur ses points d'insertion. Elles sont regroupées par 20 ou 50 et présentent une alternance régulière de bandes sombres et claires dont la parfaite correspondance au niveau d'une myofibrille à l'autre donne à la fibre un aspect strié transversal, définissant ainsi le sarcomère. L'alignement régulier des sarcomères est assuré par un réseau tridimensionnel cytosquelettique. Ce dernier assure le maintien transversal et longitudinal par des filaments intermédiaires reliant les sarcomères entre eux et par des costamères, structures reliant les myofibrilles et le sarcolemme.

#### 1.1.2. Les filaments fins d'actine

Les filaments d'actine sont attachés par une de leurs extrémités à la strie Z et se prolongent parallèlement à l'axe de la myofibrille jusqu'à la partie médiane du sarcomère, le long de la bande I puis dans la bande A. Ils sont constitués de deux chaînes (actine F), enroulées en double hélice, d'une protéine globulaire : l'actine G et de deux autres protéines : la tropomyosine qui s'étend dans la gouttière de l'hélice d'actine, et la troponine (TN) qui se fixe sur la tropomyosine (Figure 2).

#### 1.1.3. Les filaments épais de myosine

Chaque filament épais de myosine se compose d'environ 150 à 360 molécules de myosine, assemblées à la manière d'une torsade. Chaque molécule de myosine possède une partie céphalique (tête de myosine), scindée en deux, siège de l'activité ATPasique. Cette partie céphalique s'articule avec une partie cervicale, cet ensemble constituant la méromyosine lourde. Cette méromyosine lourde est réunie à une partie caudale : la méromyosine légère. La mobilité de la partie cervico-céphalique (méromyosine lourde), à la manière d'une articulation, permet la fixation réversible de la myosine à l'actine (formation du complexe actine-myosine) et le glissement des filaments

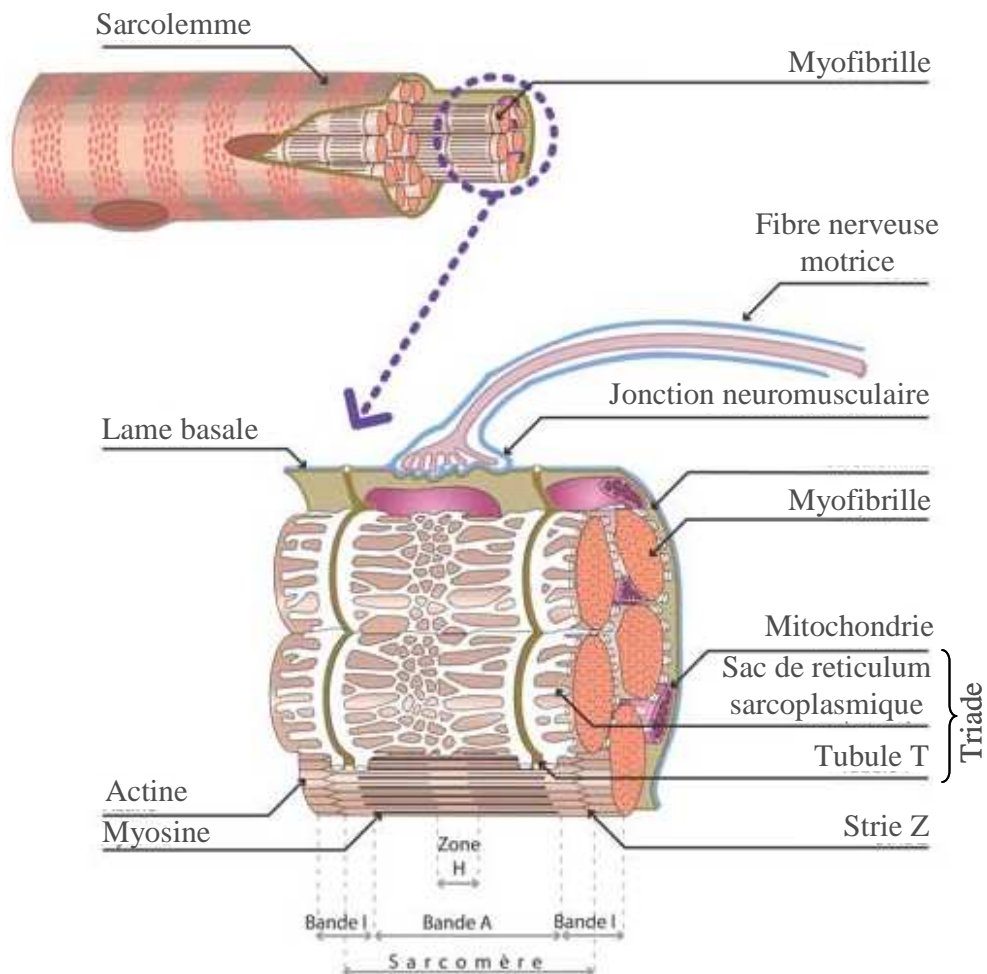


Figure 2 : Structure d'un sarcomère.

Le sarcomère (longueur au repos = 3  $\mu\text{m}$ ), segment de myofibrille compris entre deux stries Z successives, est l'unité de contraction élémentaire. Il contient des filaments fins d'actine et des filaments épais de myosine. La bande H ne contient que des filaments épais de myosine ; les parties terminales de la bande A contiennent à la fois des filaments épais de myosine et des filaments fins d'actine; la bande I ne contient que des filaments fins d'actine.



d'actine et de myosine les uns sur les autres (Figure 2).

#### 1.1.4. Les phénomènes moléculaires de la contraction musculaire

La contraction de la myofibrille striée répond à la modification des liaisons unissant les filaments d'actine et de myosine. Il en résulte une progression des filaments d'actine entre les filaments de myosine, entraînant un raccourcissement du sarcomère, donc de la myofibrille, donc du muscle. La modification structurale des liens unissant myosine et actine est associée à une hydrolyse de l'ATP musculaire, réaction étroitement dépendante de la présence d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

Plus le sarcomère est contracté, plus le disque H et les demi-disques I raccourcissent, alors que le disque A ne se modifie pas. Si le muscle est étiré, les conséquences sont inverses : le disque H et les demi-disques I deviennent plus larges et le disque A reste toujours identique. (Figure 2).

La dépolarisation de la membrane plasmique du myocyte se propage le long des membranes du système T, puis est transférée au réticulum sarcoplasmique ; la dépolarisation de la membrane du réticulum sarcoplasmique permet au  $\text{Ca}^{2+}$  qui était contenu à une concentration élevée dans les citernes du réticulum sarcoplasmique d'en sortir par des canaux- $\text{Ca}^{2+}$  transmembranaires et de se retrouver ainsi dans le cytosol ; en se fixant sur la troponine C, le  $\text{Ca}^{2+}$  entraîne la rupture de la liaison troponine I-actine, ce qui permet un léger déplacement de la molécule de tropomyosine, dégageant ainsi les sites de liaison myosine-actine qui étaient bloqués par la tropomyosine, et entraînant un contact actine-myosine ; ce contact actine-myosine déclenche l'activation de l'ATPase de la myosine qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP, ce qui entraîne la fixation de l'actine sur la myosine, ainsi que le changement de conformation de la tête de myosine. Ce dernier étant responsable du déplacement du filament d'actine et donc de la contraction de la myofibrille.

#### 1.1.5. Les fibres musculaires.

Les fibres musculaires diffèrent par leurs propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques (Cassens et Cooper, 1971). La révélation de l'activité ATPasique de la myosine (Brooke et Kaiser, 1970) ou l'utilisation d'anticorps spécifiques des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) (Duris *et al.*, 1999) qui révèlent uniquement les propriétés contractiles, permettent de distinguer trois types de fibres : I, IIA et IIX (Picard *et al.*, 2003).

Les fibres oxydatives (de type I) sont très riches en myoglobine (d'où leur coloration rouge) et en enzymes oxydatives. Elles contiennent de nombreuses mitochondries, où sont concentrées les enzymes intervenant dans le cycle de Krebs et sont riches en substrats du métabolisme aérobie (sucres, lipides). Ce sont des fibres à contractions lentes.



Les fibres oxydo-glycolytiques (de type IIA) contiennent également beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires mais, elles possèdent une coloration intermédiaire (fibres intermédiaires). Les fibres glycolytiques (de type IIX) quant à elles sont moins riches en myoglobine (donc de couleur blanche) et en enzymes oxydatives. Elles ont une haute teneur en glycogène et possèdent le plus grand diamètre. Les fibres de type II sont des fibres à vitesse de contraction rapide.

Les fibres IIX ont longtemps été classées en IIB car les techniques ne permettaient pas la distinction de ces deux types. Il semblerait que le bovin ne possède pas de fibres de type IIB, ce qui n'est pas surprenant puisque ce type de fibre présente un métabolisme purement glycolytique, sollicité pour des mouvements très rapides que ne réalisent pas les bovins. Tanabe *et al.* (1998) n'ont d'ailleurs détecté que les formes IIA et IIX des chaînes lourdes de myosine. Les fibres de type IIB n'existent en fait que chez certains animaux (rongeurs). L'homme par exemple possède le gène codant pour ce type de fibres, mais celles-ci n'apparaissent pas.

## 1.2. Métabolisme musculaire.

La régénération de l'ATP nécessaire à la contraction de fibres musculaires est assurée par deux voies métaboliques. Les fibres oxydatives produisent de l'énergie sous forme d'ATP par le système aérobie à partir du glycogène, du glucose et des acides gras en consommant de l'oxygène, tandis que les fibres glycolytiques produisent de l'énergie par le système anaérobie, en transformant le glycogène en acide lactique via la glycolyse sans consommation d'oxygène. Même si la plupart des muscles squelettiques contient une combinaison des trois types de fibres, les fibres d'une même unité motrice sont toutes d'un seul type. Dans un muscle, la contribution relative des voies oxydatives et glycolytiques à la production d'énergie peut être évaluée en mesurant le potentiel d'activité d'enzymes spécifiques de chacune de ces deux voies : la lactate déshydrogénase (LDH) pour le métabolisme glycolytique et la citrate synthase (CS) pour la voie oxydative.

### 1.2.1. Les transporteurs de glucose

Chez le ruminant, le muscle squelettique est le premier consommateur de glucose, qui couvre une part importante des besoins énergétiques musculaires (Hocquette *et al.*, 2000). Le ruminant absorbe pourtant très peu de glucose par voie digestive, mais développe une importante néoglucogénèse intrahépatique en vue de satisfaire notamment les besoins musculaires (Hocquette *et al.*, 1996).

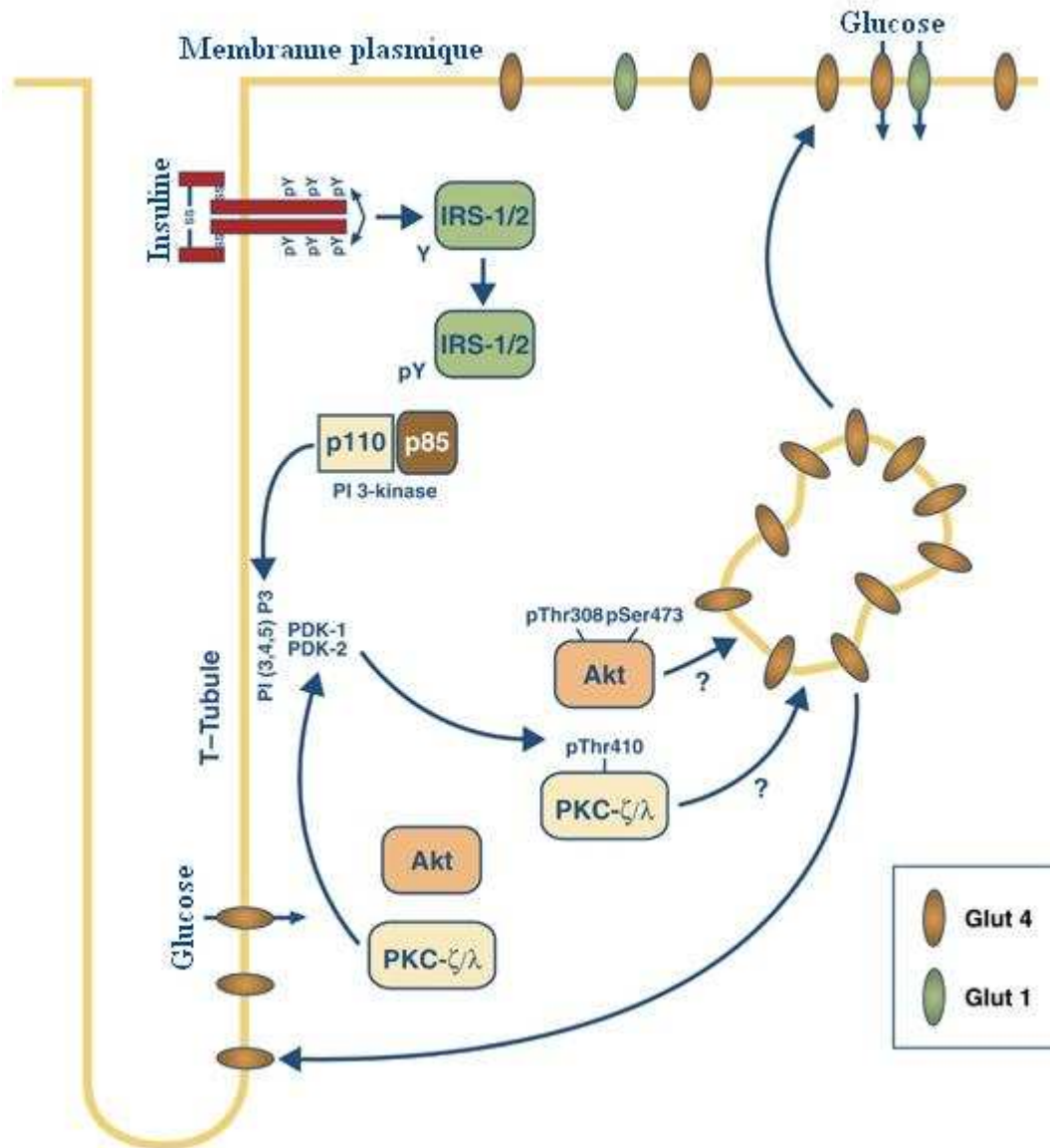


Figure 3 : Schéma d'absorption du glucose par la cellule.

L'augmentation du transport de glucose par GLUT4 nécessite sa translocation d'un pool de transporteurs d'un compartiment intracytoplasmique vers la membrane plasmique. Cette translocation fait intervenir un nombre important d'intermédiaires.

L'insuline favorise à la fois l'entrée du glucose dans le muscle et son stockage sous forme de glycogène. Il n'y a pas de glucose dans les cellules musculaires s'il n'y a pas d'insuline. Le glucose pénètre dans le myocyte strié par diffusion facilitée grâce à deux protéines transmembranaires qui servent de transporteurs, GLUT1 et principalement GLUT4 (Figure 3), une isoforme sensible à l'insuline, spécifique des tissus musculaires et adipeux (Hocquette *et al.*, 1996).

GLUT4 constitue le principal transporteur de glucose responsable de l'augmentation du captage du glucose induit par l'insuline ou la contraction musculaire. Il représente plus de 90 % de la totalité des transporteurs de glucose exprimés dans les muscles squelettique et cardiaque, et dans les tissus adipeux blanc et brun (Holman *et al.*, 1990 ; Marette *et al.*, 1992). Les mécanismes cellulaires qui modulent la captation du glucose au niveau du muscle squelettique sont complexes. Afin d'être métabolisé, le glucose sanguin doit franchir plusieurs barrières cellulaires pour finalement atteindre le cytoplasme de la cellule. Il doit notamment être transporté du sang vers l'espace interstitiel et ensuite vers l'espace intracellulaire. Le mouvement du glucose, des capillaires sanguins vers l'intérieur de la cellule, est déterminé principalement par le flot sanguin via le recrutement des capillaires, le gradient de concentration du glucose mais aussi par le nombre et l'activité des transporteurs de glucose GLUT4 mobilisés à la surface cellulaire des myocytes par l'insuline et la contraction musculaire. Le modèle simplifié de la signalisation insulinique implique que la liaison de l'insuline à son récepteur induit une autophosphorylation de celui-ci. Via la PI-3 kinase, un second messenger permet ensuite le recrutement de la serine/thréonine kinase Akt/PKB à la membrane plasmique. Suite à son activation, l'Akt/PKB se dissocie de la membrane plasmique et peut ensuite phosphoryler certains substrats cytoplasmiques et nucléaires comme l'enzyme GSK-3 (Cross *et al.*, 1995) ou la protéine mTOR (Nave *et al.*, 1999). La nature des différents effecteurs de la PI-3 kinase impliqués dans l'action stimulatrice de l'insuline sur le transport du glucose et la translocation de GLUT4 demeure encore mal définie, mais plusieurs travaux suggèrent un rôle de l'Akt/PKB dans le métabolisme du glucose activé par l'insuline (Cong *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999). Plusieurs intermédiaires ont été mis en évidence. AS160, un substrat du complexe Akt/PKB a été impliqué dans le processus de translocation de GLUT4 du à l'action de l'insuline. AS160 contient six sites consensus de phosphorylation par Akt/PKB comme un domaine Rab GAP (GTPase activating protein) (Sano *et al.*, 2003). En réponse à l'insuline, plusieurs protéines Rab sont exprimées, et Rab 4, 5 et 11 sont impliqués dans les processus de translocation de GLUT4 (Kessler *et al.*, 2000 ; Knight *et al.*, 2000). Des études *in vitro* ont montrées que le domaine GAP de AS160 est fonctionnel chez Rab 2A, 8A et 14 mais pas dans les autres formes de Rab. De plus,

celles-ci apparaissent comme présentes dans les micro-vésicules contenant GLUT4 (Miinea *et al.*, 2005). Bien qu'il ne soit pas encore connu quelles isoformes de Rab sont régulées *in vivo* par le GAP domaine de AS160, une sur-expression d'une forme mutante dominante de AS160 montre un blocage de la translocation de GLUT4 (Zeigerer *et al.*, 2004). Ces données suggèrent le rôle important de AS160 comme un lien fonctionnel important entre la voie de la PI3 kinase par l'intermédiaire du complexe Akt/PKB et le trafic cellulaire impliqué dans la translocation de GLUT4. Plus récemment, la protéine Synip a été identifiée comme un autre substrat du complexe Akt/PKB (Yamada *et al.*, 2005). Une phosphorylation de la protéine Synip par le complexe Akt/PKB entraîne une dissociation du complexe synip-syntaxine 4 permettant la formation du couple syntaxine 4 et VAMP2 ceci facilitant la fusion des vésicules contenant GLUT4 avec la membrane plasmique. Bien que la phosphorylation insulino-dépendante de Synip par le complexe Akt/PBK soit controversée, cela pourrait être un mécanisme envisageable pour la fusion des vésicules contenant GLUT4 avec la membrane plasmique.

Il est reconnu que les effets de la contraction musculaire sont tout à fait indépendants de l'action de l'insuline puisque la contraction musculaire de muscles isolés peut stimuler le transport du glucose même en absence d'insuline (Ploug *et al.*, 1984 ; Nesher *et al.*, 1985 ; Richter *et al.*, 1985). Contrairement à l'insuline, il a été rapporté que la PI-3 kinase n'est pas impliquée dans la stimulation du transport du glucose et la translocation de GLUT4 par la contraction musculaire ou par l'exercice.

Les muscles oxydatifs présentent, chez le ruminant, un contenu en GLUT4 plus faible que celui des muscles glycolytiques ou oxydo-glycolytiques (Hocquette *et al.*, 1995). Cette spécificité des ruminants pourrait être interprétée comme un moyen pour limiter l'utilisation du glucose par les muscles oxydatifs et le rediriger ainsi vers d'autres sites tels que les muscles glycolytiques, qui sont des consommateurs obligés de glucose. Au sein du tissu musculaire, le glucose peut suivre différentes voies métaboliques : oxydation, transformation en lactate, synthèse de glycogène, synthèse d'acides gras, en particulier dans les adipocytes intramusculaires (Smith et Crouse, 1984). A l'exception de la synthèse de glycogène, ces différentes voies métaboliques empruntent toutes un même chemin initial, celui de la glycolyse.

### 1.2.2. Le glycogène.

Le glycogène est une forme sous laquelle le sucre ou plus exactement le glucose est stocké pour pouvoir avoir une disponibilité de production d'énergie rapide. Le foie réalise la

glycogénolyse pour reformer du glucose à partir de ses réserves de glycogène. Sa synthèse à partir du glucose constitue une voie majeure de transformation de celui-ci dans les cellules musculaires (Lebret *et al.*, 1999). Le glycogène intramusculaire, qui représente environ 1% du poids du muscle, est stocké dans les fibres musculaires sous la forme de granules localisés dans le sarcoplasme. Le glycogène constitue la source énergétique principale des fibres glycolytiques (blanches) qui le dégradent rapidement en acide lactique lorsqu'elles se contractent. En générale, les fibres à contraction lente contiennent moins de glycogène que les fibres à contraction rapide (Cassens et Cooper, 1971) car elles sont beaucoup plus fréquemment sollicitées que les fibres rapides en particulier rapides glycolytiques. Contrairement au cas du foie, le glucose ainsi produit par la cellule musculaire ne peut être utilisé que par cette même cellule. La production de glycogène dans l'organisme est stimulée par l'insuline et sa dégradation en glucose est stimulée par le glucagon et l'adrénaline.

### 1.2.3. Les lipides intramusculaires.

Les tissus musculaires et adipeux sont impliqués de façon majoritaire dans le stockage et l'utilisation des ressources énergétiques, essentiellement sous la forme de graisses et de sucres. Le tissu adipeux a une fonction de réserve énergétique, grâce à sa richesse en cellules capables de stocker des lipides. Le développement, la croissance et le métabolisme du tissu musculaire sont extrêmement complexes et directement associés à ceux d'autres tissus, en particulier le tissu adipeux. Le tissu adipeux intramusculaire se développe par des phénomènes d'augmentation du nombre (hyperplasie) ou d'augmentation de la taille (hypertrophie) des adipocytes intramusculaires au cours de la croissance (Lee et Kauffman, 1974). Chez le bovin, la teneur en lipides intramusculaires varie entre 1 et 7 % selon les muscles. Ces lipides sont constitués de lipides de réserve (les triglycérides) et de lipides membranaires (les phospholipides) dont les proportions respectives varient selon les muscles. La teneur plus élevée des muscles rouges en phospholipides est souvent attribuée à un nombre plus élevé de mitochondries. Au sein du muscle, les triglycérides sont à la fois présents à l'intérieur des fibres musculaires sous forme de gouttelettes lipidiques et à l'extérieur des fibres dans des adipocytes intramusculaires. La synthèse d'acides gras dans le muscle se déroule plus particulièrement au sein des adipocytes intramusculaires (Smith et Crouse, 1984). Le tissu musculaire, quant à lui, a besoin d'avoir de l'énergie immédiatement disponible pour assurer la contraction musculaire. Il est le site principal d'utilisation du glucose et des acides gras. Un stockage anormal de graisses dans les muscles peut conduire à une lipotoxicité et à une résistance à l'insuline. La régulation de cet équilibre fait intervenir de nombreux acteurs dont par





exemple la leptine, une hormone sécrétée par les adipocytes qui a pour effet de stimuler l'oxydation des acides gras dans les muscles et ainsi d'augmenter la sensibilité à l'insuline. Cette action se fait entre autre par l'intermédiaire de l'AMPK (AMP dependent Protein Kinase) (Minokoshi *et al.*, 2002) et de l'ACC (Acetyl CoA Carboxylase) qui ont un rôle majeur dans l'équilibre entre les sucres et les acides gras dans le muscle.

Le bon fonctionnement d'une cellule, et donc d'un organisme, nécessite une gestion rigoureuse de l'équilibre entre le stockage et la disponibilité des ressources. L'exemple le plus connu de dysfonctionnement entraînant la perte de cet équilibre chez l'homme est le diabète de type II. Les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) sont des récepteurs nucléaires activés par certains acides gras polyinsaturés et leurs métabolites. Plusieurs travaux (Auboeuf *et al.*, 1997 ; Hegele *et al.*, 2000 ; Doney *et al.*, 2004 ; Ghossaini *et al.*, 2005 ; Soriguer *et al.*, 2006) ont mis en évidence un rôle de ces récepteurs nucléaires dans l'insulino-résistance. Pour mieux comprendre comment les PPARs pourraient interférer avec l'action de l'insuline, des gènes cibles dans les cellules musculaires humaines ont été recherchés afin d'étudier leur régulation par les acides gras. Un de ces gènes code pour la p85aPI3kinase dont l'expression est induite par PPAR $\gamma$  dans les adipocytes et par PPAR $\alpha$  dans les myotubes, conduisant, dans les 2 types cellulaires, à une amélioration de la signalisation insulinique (Rieusset *et al.*, 2001 ; Rieusset *et al.*, 2001). Le diabète n'est bien sûr pas un problème chez le bovin, mais les connaissances acquises sur tout déséquilibre du métabolisme renseignent forcément sur la régulation du métabolisme et *vice versa*.

Le gène *PPARG* code deux facteurs de transcription (PPAR $\gamma_1$  et PPAR $\gamma_2$ ) appartenant à la famille des PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) qui comprend également les PPAR  $\alpha$  et  $\delta$ . Ces récepteurs constituent une sous-famille de récepteurs nucléaires qui sont tous activés par des acides gras ou des dérivés d'acides gras ainsi que par des ligands synthétiques. Les PPAR $\gamma$  forment des hétérodimères avec les récepteurs rétinoïques (RXR) et ces dimères assurent la régulation de nombreux gènes en se fixant sur des domaines particuliers dans les régions promotrices. Les récepteurs PPAR $\gamma_1$  et PPAR $\gamma_2$  ont un rôle majeur dans la mise en place et le métabolisme du tissu adipeux mais il apparaît de plus en plus clair que leur action ne se limite pas à ce tissu mais concerne aussi d'autres tissus et d'autres mécanismes comme l'action de l'insuline, le cycle cellulaire, les réactions inflammatoires et, de façon générale, la gestion des stocks énergétiques (Auwerx, 1999). Ils sont des acteurs majeurs de la différenciation cellulaire dans de nombreux tissus (foie, muscle, fibroblastes, cellules épithéliales). Ils ont également des propriétés anti-inflammatoires et pourraient jouer un rôle dans la survenue ou la prévention des maladies cardiovasculaires (Vamecq et Latruffe, 1999).

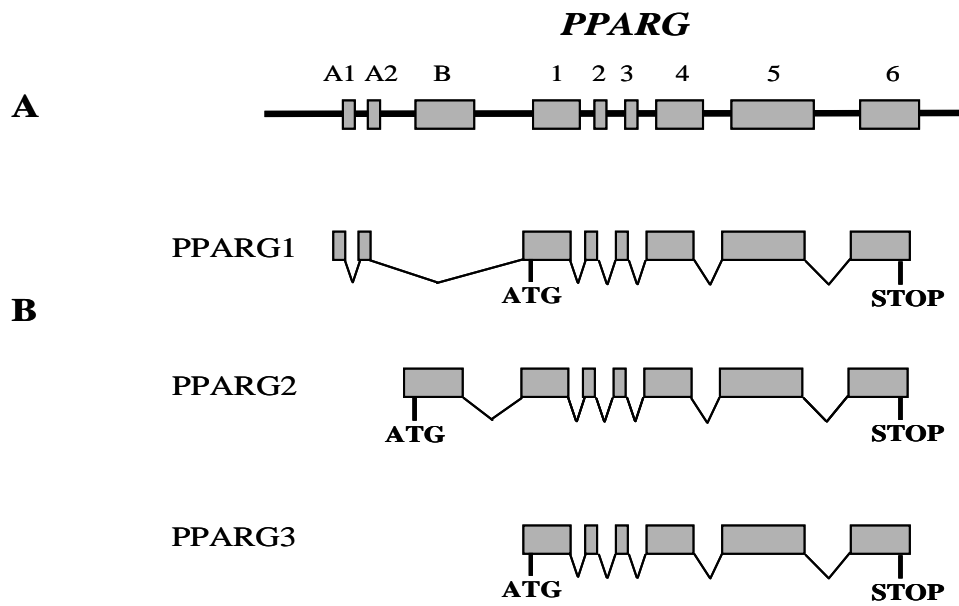


Figure 4 : Structure schématique du gène *PPARG*.

Le gène *PPARG* est composé de 9 exons et peut donner lieu à la formation de trois transcrits différents  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ .

#### 1.2.3.1 Structure du gène *PPARG*.

Le gène *PPARG* est constitué de neuf exons couvrant une distance de 145 kb chez l'homme. Trois transcrits différents issus de trois promoteurs ont été décrits pour le gène humain (Fajas *et al.*, 1997 ; Fajas *et al.*, 1998) mais seulement deux pour le gène murin (Zhu *et al.*, 1995) et pour l'instant deux pour le gène bovin (Sundvold *et al.*, 1997). Le gène bovin a été localisé sur le chromosome 22. Les transcrits diffèrent par leur extrémité 5' : *PPARG1* possède deux exons non traduits (A1 et A2) et des exons codants (1 à 6), *PPARG2* possède un exon spécifique (B) dans lequel débute la traduction et les exons codants 1 à 6 communs avec le transcrit *PPARG1*. Le transcrit humain *PPARG3* débute sa transcription et sa traduction au niveau de l'exon 1, donnant ainsi une protéine identique à celle obtenue pour le transcrit *PPARG1* car les exons A1 et A2 ne sont pas traduits (Figure 4).

#### 1.2.3.2. Distribution des transcrits du gène *PPARG*.

La distribution tissulaire des transcrits est différente, *PPARG1* est majoritairement exprimé dans le foie, le tissu adipeux et l'intestin alors que l'expression de *PPARG3* est limitée au tissu adipeux et à l'intestin et *PPARG2* ne s'exprime presque exclusivement dans le tissu adipeux. Les transcrits sont très peu présents dans les muscles. Il apparaît cependant que l'expression de *PPARG* dans le muscle soit associée avec l'obésité et le diabète (Park *et al.*, 1997). La délétion du gène *PPARG* limitée aux muscles squelettique et cardiaque induit une résistance sévère à l'insuline (Park *et al.*, 1997), ce qui montre bien son action dans la régulation du métabolisme du glucose dans le muscle. Les expériences montrent que *PPARG* est un point de contrôle important non seulement dans le tissu adipeux mais aussi dans le muscle et le foie : un traitement par thiazolidinediones pendant trois semaines est efficace sur le foie et le tissu adipeux mais reste inefficace sur le degré d'insulinorésistance en l'absence de *PPARG* dans le muscle.

#### 1.2.3.3. Action de $PPAR\gamma$ .

Le récepteur nucléaire  $PPAR\gamma/RXR\alpha$  régule l'homéostasie du glucose et des lipides, et est la cible pour les drogues antidiabétiques comme les thiazolidinediones. Gampe *et al.* (2000) ont établi les structures cristallographiques des domaines de fixation du ligand de  $PPAR\gamma$  et de  $RXR\alpha$  complexés avec de l'acide 9-cis-retinoïque pour  $RXR\alpha$  et la drogue GI262570 pour  $PPAR\gamma$ . Ces hétérodimères avec beaucoup de récepteurs nucléaires. Mukherjee *et al.* (1997) ont constaté que  $PPAR\gamma_1$  ou  $PPAR\gamma_2$  seuls ne forment pas de complexes avec des oligonucleotides contenant les structures cristallographiques ont permis de mieux comprendre la capacité des RXRs à former des

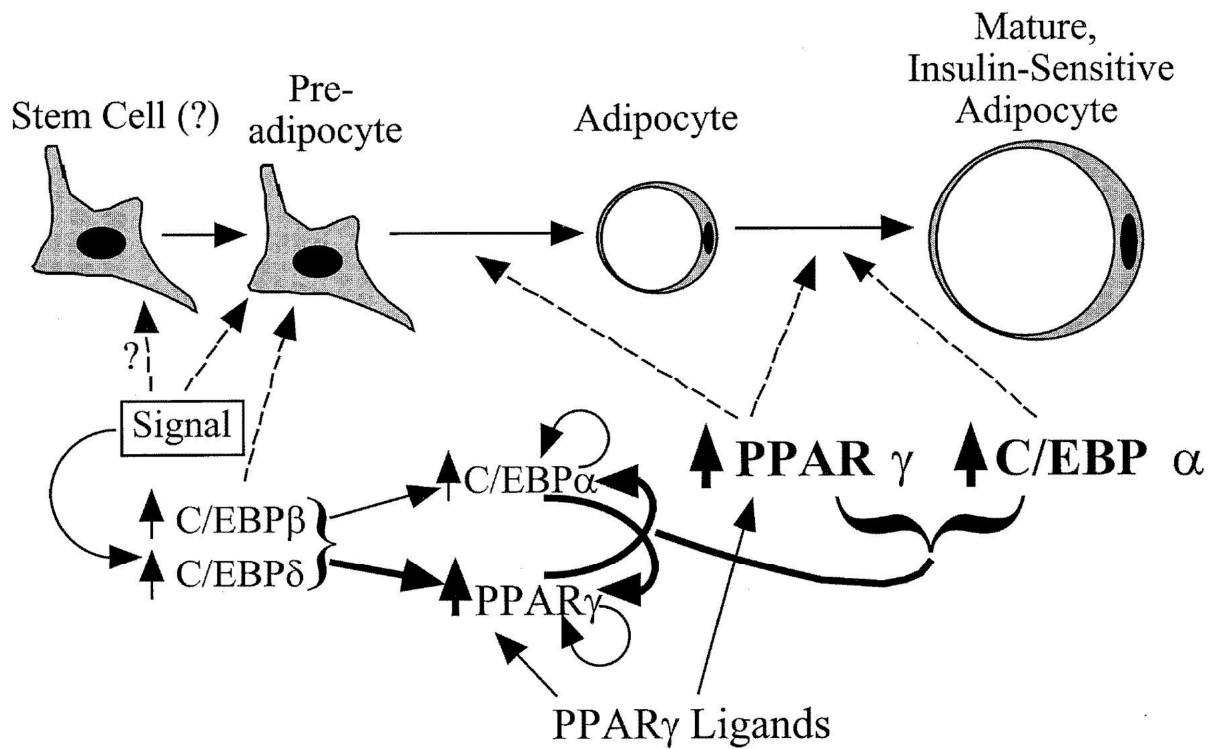


Figure 5 : Contrôle moléculaire de l'adipogénèse (d'après Mukherjee *et al.* (1997)).

La différenciation des adipocytes à partir des cellules souches est régulée par de nombreux signaux et facteurs de transcription. Des signaux dont la nature est inconnue agissent sur les cellules souches et/ou pré-adipocytes en augmentant l'expression des C/EBP  $\delta$  et  $\beta$ , lesquels vont agir sur l'expression de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$ . Ces deux derniers stimulent leur expression mutuelle et s'auto-stimulent, permettant le maintien d'un fort niveau d'expression. PPAR $\gamma$  induit la différenciation des adipocytes et, à l'aide de C/EBP $\alpha$ , conduit à leur maturation et influence leur métabolisme.

éléments de réponse des péroxisomes proliférateurs (PREs), mais PPAR $\gamma_1$  et PPAR $\gamma_2$  se fixent aux PREs sous forme d'hétérodimères avec RXR. PPAR $\gamma_1$  et PPAR $\gamma_2$  peuvent également former des complexes avec RXR $\beta$  et RXR $\gamma$ . PPAR $\gamma_1$  et PPAR $\gamma_2$  présentent un même degré de réponse aux activateurs de PPAR $\gamma$ . Les protéines PPAR $\gamma$  sont stimulées par de nombreux facteurs adipogéniques et anti-adipogéniques et régulent de nombreux gènes dont certains sont eux-mêmes des facteurs de transcription, comme par exemple C/EBP (CCAATT Enhancer Binding Proteins) ou ADD-1/SREBP-1. Ces différents facteurs de transcription agissent en fait en synergie, se régulent mutuellement et s'autorégulent (Figure 5). Ensemble, ils assurent la régulation de nombreux gènes impliqués entre autre dans la différenciation et le métabolisme des adipocytes.

#### 1.2.4. La protéine kinase AMP dépendante.

La protéine kinase AMP dépendante (AMPK) a été définie au départ comme une protéine kinase qui phosphoryle et inactive à la fois la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl (HMG)-CoA reductase (Beg *et al.*, 1973) et l'acétyl-CoA réductase (Carlson et Kim, 1973). En raison de ses multiples rôles physiologiques, elle a été rebaptisée par référence à son activateur : l'AMP (Hardie *et al.*, 1989 ; Hardie et Hawley, 2001). La première mise en évidence de l'activation de l'AMPK en réponse à un stress métabolique date de 1991 lorsque Moore *et al.* (1991) ont montré que l'AMPK était activée par un épuisement en ATP lors d'une incubation d'hépatocytes isolés de rat avec du fructose.

L'AMPK est considérée comme une enzyme clé dans la régulation du métabolisme énergétique. Son rôle est de maintenir un fort taux d'ATP dans la cellule. L'AMPK est activée physiologiquement par l'augmentation de la concentration intracellulaire en AMP lors des situations de carence énergétique cellulaire (hypoxie, hypoglycémie et exercice physique) (Winder et Hardie, 1999). Dans ces circonstances, l'ATP est fortement consommée et le rapport ATP/AMP diminue. L'activation de l'AMPK réduit les voies métaboliques consommatrices d'énergie (comme la lipogénèse ou la synthèse stéroïdienne) et augmente les voies productrices d'ATP (comme la glycolyse, l'oxydation des acides gras). La contraction musculaire provoque une augmentation importante de la consommation en ATP. Au niveau cellulaire, on observe une plus grande prise et oxydation du glucose sanguin et des acides gras, mais également une augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT4 (Figure 6) et de l'hexokinase (HKII) (Holmes *et al.*, 1999). L'AMPK ne semble pas être requise pour le métabolisme anaérobie du glycogène endogène mais est exigée à la place comme un commutateur pour l'oxydation aérobie. L'analyse génétique faite chez la levure montre que le complexe SNF1 (équivalent de l'AMPK chez la levure) est nécessaire

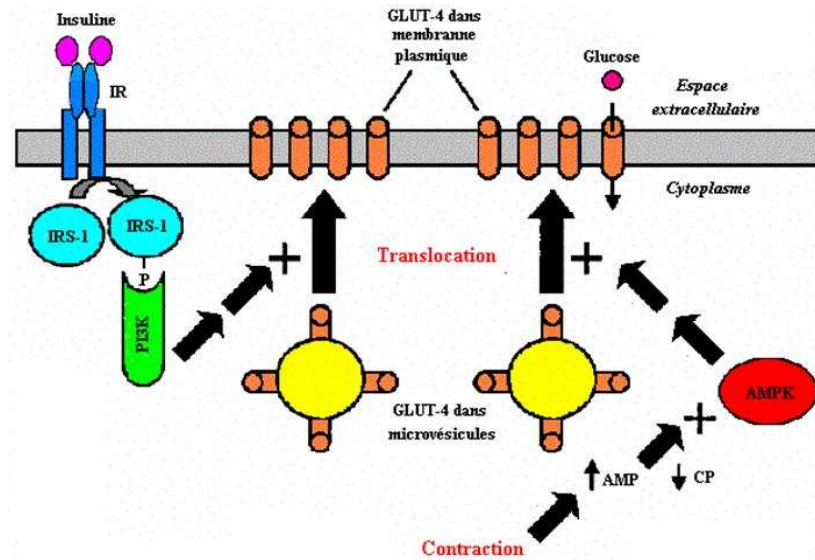


Figure 6 : Voie alternative de translocation de GLUT4.

En plus de la voie principale de translocation de GLUT4 à la membrane plasmique faisant intervenir l'insuline et ses différents seconds messagers, il existe une voie alternative mise en place lors de la contraction musculaire. Lors de la contraction musculaire, une augmentation du taux en AMP cellulaire, provoque une activation de l'AMPK qui va favoriser la translocation de GLUT4 au niveau de la membrane plasmique.

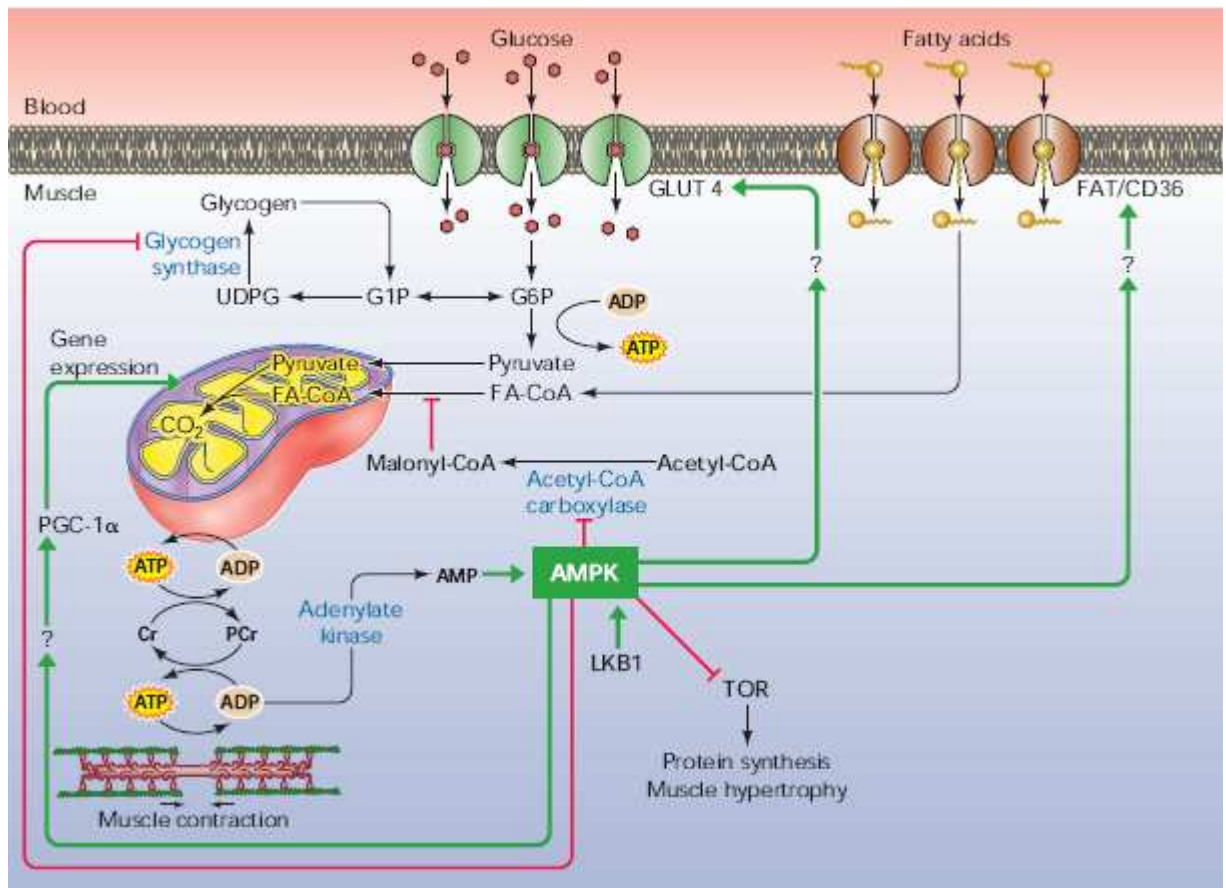
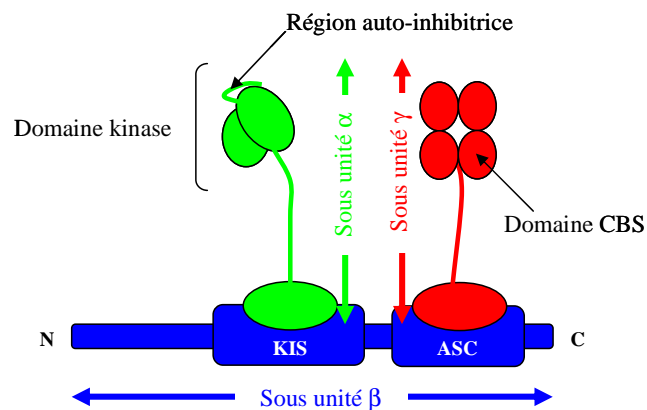


Figure 7 : Changements métaboliques induits par l'AMPK.

Sous l'effet d'une contraction, l'AMPK va stimuler les voies productrices d'ATP (en vert) et inhiber les voies consommatrices d'énergie (en rouge). Sous l'effet de la contraction, l'ATP disponible va être consommé en produisant de l'ADP puis de l'AMP. Le taux d'AMP élevé dans la cellule active l'AMPK qui va induire l'expression de certains gènes et provoquer la translocation de GLUT 4 au niveau de la membrane plasmique pour permettre l'entrée du glucose, nécessaire à la production d'énergie, dans la cellule. L'AMPK va, par ailleurs, inhiber des voies consommatrices d'énergie comme la synthèse de protéine, mais également empêcher le stockage du glucose sous forme de glycogène.

### A. Conformation inactive



### B. Conformation active

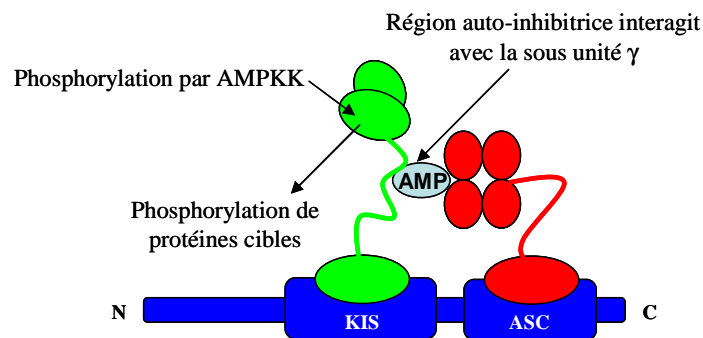


Figure 8 : Modèle de structure de l'AMP kinase (Cheung *et al.*, 2000).

La sous unité  $\alpha$  est la sous unité catalytique possédant à son extrémité N-terminale le domaine kinase ainsi qu'une région auto-inhibitrice en C-terminal. Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont des sous-unités régulatrices. La sous-unité  $\beta$  lie les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  par ses domaines KIS (Kinase Interacting Sequence) et ASC (Association with SNF1 Complex). En absence d'AMP, la région auto-inhibitrice est liée au domaine kinase empêchant ainsi les phosphorylations par l'AMPKK. L'AMP va activer l'enzyme en liant la région auto-inhibitrice à la sous unité  $\gamma$ , et en permettant l'accès de l'AMPKK qui va phosphoryler la sous- unité  $\alpha$ . Cette phosphorylation ainsi que la présence d'AMP vont activer le domaine kinase capable alors de phosphoryler des protéines cibles.



pour passer du métabolisme (fermentaire) anaérobie du glucose à un métabolisme oxydatif du glucose (Hardie *et al.*, 1998). Un des mécanismes proposé veut que, durant les premières minutes de contraction, l'activité de l'AMPK soit régulée allostériquement par le contenu en AMP, ATP et créatine phosphate (CP) et que sa régulation subséquente soit dépendante du contenu en glycogène (Stephens *et al.*, 2002).

Une conséquence de l'exercice est l'hypertrophie musculaire, c'est à dire le volume accru de muscle dû aux augmentations de synthèse de protéines et du volume de la fibre du muscle. Une cible récemment identifiée pour l'AMPK est la voie de la protéine kinase TOR (Target Of Rapamycin), qui est activée par l'insuline, les facteurs de croissance et les acides aminés (Kimura *et al.*, 2003). Elle stimule la synthèse de protéine, et par conséquent la croissance et l'hypertrophie des cellules (Figure 7).

#### 1.2.4.1. Structure de l'AMPK

L'AMPK forme un complexe hétérotrimérique composé de la sous-unité catalytique  $\alpha$  et des sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  ; l'ensemble forme un complexe fonctionnel appelé holoenzyme (Figure 8). L'AMPK est une protéine kinase fortement conservée, et les gènes codant les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  présentent de grandes homologies entre les espèces. L'enzyme des mammifères possède des orthologues chez tous les eucaryotes du protozoaire primitif *Giardia lamblia* à l'humain (Hardie, 2003). Des études génétiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que l'homologue de l'AMPK (complexe SNF1) est requis en réponse à une privation de glucose (Hardie *et al.*, 1998). Chez la levure, cet orthologue est également un trimère avec une sous-unité catalytique et deux sous-unités régulatrices.

La sous-unité  $\alpha$  (63 kDa) contient un domaine catalytique renfermant l'activité kinase dans son extrémité N-terminale, un domaine C-terminal régulateur contenant la région auto inhibitrice de la kinase et le domaine de liaison à la sous-unité  $\beta$ . Dans des conditions d'activation, l'AMPK est phosphorylée par l'enzyme LKB1 sur la Thréonine 172 (T 172) située dans le domaine catalytique. Il existe deux isoformes de la sous-unité  $\alpha$  chez les mammifères,  $\alpha 1$  (548 résidus) et  $\alpha 2$  (552 résidus), partageant 61% d'identité. L'homologue de cette sous-unité chez la levure est Snf1 (Stapleton *et al.*, 1996 ; Hamilton *et al.*, 2002).

La sous-unité  $\beta$  (40 kDa) est l'une des sous-unités régulatrices de l'AMPK. Elle a pour rôle de lier la sous-unité  $\alpha$  par son domaine KIS (Kinase Interacting Sequence) et la sous-unité  $\gamma$  par son

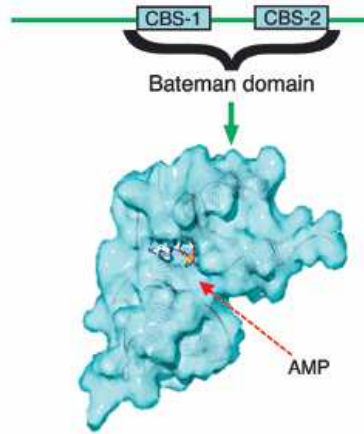


Figure 9 : Structure cristallographique d'un domaine Bateman.

Ici est représenté le domaine Bateman formé par les sequences CBS 1 et CBS 2 de la sous-unité  $\gamma_1$  avec une molécule d'AMP située au milieu.

domaine ASC (Association with SNF1 Complex). La sous-unité  $\beta$  peut être myristoylée en position N-terminale et phosphorylée, mais la signification de cette phosphorylation reste encore inconnue. On trouve deux isoformes de la sous-unité  $\beta$  chez les mammifères,  $\beta_1$  (270 résidus) et  $\beta_2$  (272 résidus), possédant 71% d'identité. Il existe un homologue de la sous-unité  $\beta$  chez la levure, le complexe Sip1/Sip2/Gal83p (Thornton *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 1999). En plus des domaines de fixation aux sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ , toutes les sous-unités  $\beta$  possèdent un domaine de fixation au glycogène (GBD) (Hudson *et al.*, 2003 ; Polekhina *et al.*, 2003). Ce domaine GBD est très conservé entre les différentes espèces eucaryotes et permet des interactions entre l'AMPK et le glycogène. Cependant le rôle de ce domaine est encore inconnu. La glycogène synthase est une cible de l'AMPK dans le muscle squelettique, et l'une des possibilités serait que ce domaine GBD colocalise l'AMPK avec son substrat. Une autre possibilité est que l'AMPK ne régule pas seulement les réserves d'énergie à court terme comme l'ATP mais aussi les réserves à moyen terme comme le glycogène. Wojtaszewski *et al.* (2002) ont montré qu'un fort taux de glycogène dans le muscle réprime l'activation de l'AMPK par le 5-aminoimidazole-4-carboxamide 1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) dans le muscle de rat, ainsi que par l'exercice dans le muscle humain (Wojtaszewski *et al.*, 2003).

La sous-unité  $\gamma$  est l'homologue de Snf4 de levure. On trouve trois isoformes de la sous-unité  $\gamma$  chez les mammifères :  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ . Elles diffèrent par leur extrémité N-terminale (plus ou moins variable selon l'isoforme). De plus, deux transcrits différents ont été décrits pour le gène *PRKAG2* (Gollob *et al.*, 2001). Ces transcrits diffèrent par leurs extrémités 5', donnant ainsi une forme longue ( $\gamma_2L$ ) et une forme courte ( $\gamma_2S$ ) de la protéine  $\gamma_2$ . En revanche, la région C-terminale est très conservée et contient quatre répétitions en tandem d'un motif structural appelé domaine CBS (Cystathionine  $\beta$ -syntase). Ces domaines CBS, longs d'environ 60 résidus, sont retrouvés dans plusieurs protéines dont l'IMP déshydrogénase (IMPDH). Dans le cas de la Cystathionine  $\beta$ -syntase où ils ont été découverts, ils seraient impliqués dans l'activation allostérique de l'enzyme par la S-adenosyl méthionine. La cristallisation de la protéine IMPDH montre que deux domaines CBS contigus forment un domaine structural discret (Figure 9) appelé domaine Bateman. Pour l'AMPK, ces domaines seraient le lieu de fixation de l'AMP au niveau de la sous-unité  $\gamma$ . Des constructions contenant l'un ou l'autre des deux domaines Bateman de la sous-unité  $\gamma_2$  fixent une molécule d'AMP ou d'ATP de manière exclusive, alors que des constructions présentant les deux domaines fixent deux molécules d'AMP ou ATP de manière coopérative (Scott *et al.*, 2004). La sous-unité  $\gamma$

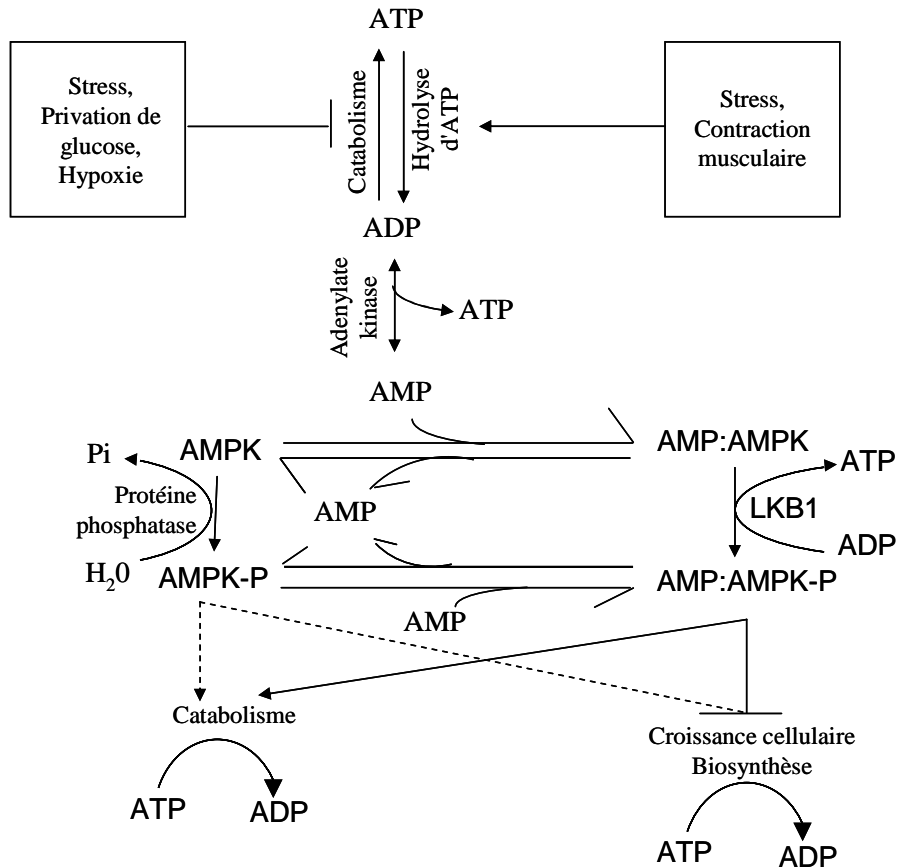


Figure 10 : Mécanismes de régulation de l'AMPK (d'après Hardie (2005)).

Le stress cellulaire qui inhibe la production d'ATP ou accélère sa consommation cause une élévation du ratio ADP/ATP, qui est amplifiée par l'adénylate kinase. L'AMP se fixe sur l'AMPK, ce qui favorise la phosphorylation par LKB1 pour activer le complexe AMPK. La protéine kinase activée va éteindre les voies consommatrices d'énergie et activer les voies productrices d'ATP. Une fois le stress cellulaire terminé, l'activité est réduite par la dissociation de la molécule d'AMP du complexe, entraînant une perte d'activation allostérique. Mais ceci favorise également la déphosphorylation du complexe par les protéines phosphatases afin d'inactiver entièrement le complexe.

de l'AMPK est N-acétylée mais ne porte aucune autre modification post-traductionnelle (Kemp *et al.*, 1999 ; Cheung *et al.*, 2000).

La sous-unité  $\alpha$  est instable seule et les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont essentielles pour son activité. Les sous-unités du complexe existent sous plusieurs isoformes, chacune étant codée par deux ou trois gènes différents chez les mammifères. Chacune des sept sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  est codée par un gène différent. Pour augmenter cette diversité, il s'ajoute à ceci la présence d'épissages alternatifs, ainsi que de sites alternatifs de démarrage de la transcription. Le taux d'expression des différentes isoformes varie selon les tissus et toutes les combinaisons (soit 12 au total) sont possibles. Cependant, le complexe qui prédomine dans la majorité des types cellulaires est le complexe  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  ; le muscle squelettique présente la particularité d'exprimer la totalité des sept différentes isoformes, incluant la sous-unité  $\gamma 3$  (Mahlpuu *et al.*, 2004).

#### 1.2.4.2. Régulation de l'AMPK

L'AMPK est un intermédiaire des voies de transduction du signal ; elle fait partie de la famille des Sérine/Thréonine kinases (Hardie and Carling, 1997 ; Hardie *et al.*, 1998). Bien qu'elle tienne son nom de son activateur allostérique l'AMP, son effet est faible et insignifiant à comparer de la phosphorylation de l'AMPK effectuée par une autre kinase, la protéine kinase LKB1 identifiée comme étant la protéine activatrice de l'AMPK (Shaw *et al.*, 2004). Cette modification par phosphorylation du résidu Thréonine (Thr172) situé sur le domaine kinase de la sous-unité  $\alpha$  est essentielle pour l'activité kinase du complexe (Hawley *et al.*, 1996 ; Stein *et al.*, 2000). Un modèle (Figure 8) pour expliquer l'activation de l'AMPK par l'AMP repose sur la fixation du nucléotide à l'interface entre les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ . Il empêcherait ainsi l'association entre la région auto-inhibitrice et le domaine kinase de la sous-unité  $\alpha$ . Cette association se produit en absence d'AMP. La fixation de l'AMP stimule la phosphorylation par LKB1 et diminue la déphosphorylation par les protéines phosphatases. Ce triple mécanisme (Figure 10) assure une réponse extrêmement sensible à une petite élévation en AMP dans la cellule. Ces trois effets activateurs par l'AMP sont supprimés en présence de concentrations élevées en ATP, le système ne répond pas seulement à une augmentation du taux d'AMP cellulaire mais également à une augmentation du ratio AMP/ATP dans la cellule. Ce mode de régulation est conforme au modèle classique de Monod *et al.* (1965) pour les enzymes allostériques. Le site exact de fixation de l'AMP reste encore inconnu (Cheung *et al.*, 2000). L'activation de l'AMPK par l'AMP dépend des isoformes  $\alpha$  et  $\gamma$  présentes dans le

complexe. Ainsi, le complexe  $\alpha 1\beta 2\gamma 1$  peut être activé d'un facteur 13 par l'AMP (Stein *et al.*, 2000).

L'AMPK subit également une régulation allostérique négative par la créatine phosphate (CP) et l'ATP. Une augmentation en ATP ou en CP inhibe l'AMPK. Par contre, si la CP est un inhibiteur allostérique de l'AMPK, elle n'a aucun effet sur la phosphorylation par LKB1 (Winder, 2001).

Puisqu'une élévation du taux en AMP déclenche la phosphorylation et l'activation de l'AMPK, un poison métabolique, empêchant la synthèse d'ATP par les mitochondries (Hawley, 2004), va activer l'AMPK en augmentant le rapport AMP:ATP. La metformine et les drogues de thiazolidinedione comme le rosiglitazone (deux des médicaments actuellement les plus largement prescrits contre le diabète de type 2) sont capables d'activer l'AMPK (Fryer *et al.*, 2002).

Les thiazolidinediones ont une autre cible : le récepteur activé pour les proliférateurs des peroxyosomes gamma (PPAR $\gamma$ ). L'activation de l'AMPK explique les actions thérapeutiques de la metformine. La metformine, les thiazolidinediones ainsi que la phenformine sont des inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Brunmair *et al.*, 2004). Ces drogues activent l'AMPK indirectement en augmentant le rapport cellulaire AMP/ATP (Fryer *et al.*, 2002 ; Hawley *et al.*, 2005).

#### 1.2.4.3. L' AICAR : un activateur de l'AMPK

Le 5'-aminoimidazole-4-carboxamide 1  $\beta$ -D-ribofuranoside, mieux connu sous le nom de AICAR, est un analogue de l'adénosine qui a été proposé comme agent mimétique de la contraction musculaire sur le transport du glucose au niveau du muscle squelettique. L' AICAR est transporté à l'intérieur de la cellule par des transporteurs de nucléosides où il est transformé dans le cytoplasme en ZMP par l'adénosine kinase. Le ZMP est un analogue de l'AMP qui mime les effets de l'AMP en amplifiant la phosphorylation de l'AMPK par l'AMPKK (Corton *et al.*, 1995) et en activant allostériquement l'AMPK (Corton *et al.*, 1995 ; Henin *et al.*, 1996), ceci sans faire varier les concentrations en AMP et en ATP présentes dans la cellule.

Plusieurs études ont révélé que le AICAR, tout comme la contraction musculaire, produisait une augmentation de l'activité de l'AMPK et du transport du glucose (Bergeron *et al.*, 1999),

parallèlement à une stimulation de la translocation de GLUT4 (Figure 7) au niveau des muscles squelettiques (Hayashi *et al.*, 1998 ; Kurth-Kraczek *et al.*, 1999) et cardiaque (Russell *et al.*, 1999). Contrairement à l'insuline, ces travaux ont rapporté que la contraction musculaire et l'AICAR n'avaient pas d'effets additifs sur le transport du glucose dans le muscle squelettique. De plus, leurs effets sont insensibles à la wortmannine, un inhibiteur de la PI-3 kinase. Ces données suggèrent donc que ces deux stimuli utilisent une même voie de signalisation intracellulaire, indépendante de la PI-3 kinase, pour stimuler le transport du glucose. De plus, l'effet de l'AICAR sur le transport du glucose dans le muscle EDL est complètement inhibé chez des souris transgéniques exprimant la forme dominante négative de l'AMPK  $\alpha_2$  dans le muscle, suggérant ainsi que le transport musculaire du glucose stimulé par l'AICAR est dépendant de l'activation de l'AMPK (Mu *et al.*, 2001).

Il a été montré que l'AICAR stimule la prise de glucose en absence d'insuline en provoquant la translocation de GLUT4 sur la membrane plasmique (Merrill *et al.*, 1997 ; Kurth-Kraczek *et al.*, 1999). Comme l'AMPK est activée au cours de l'exercice, cela expliquerait chez l'homme l'effet bénéfique que peuvent apporter des exercices physiques à des patients atteints de diabète insulino-résistant (type II). La caractérisation de cette voie pourrait ainsi se révéler porteuse de progrès thérapeutiques dans le cas du diabète de type II (Shepherd et Kahn, 1999).

#### 1.2.4.4. Identification de la kinase en amont de l'AMPK

Les travaux récents sur la levure et l'étude de la régulation du complexe SNF1 (homologue de l'AMPK) ont permis l'identification de kinases activatrices de l'AMPK par phosphorylation de la T172 de la sous-unité  $\alpha$ . Trois kinases homologues (Elm1, Pak1 et Tos3) ont été identifiées pour phosphoryler et activer SNF1 *in vitro* (Hong *et al.*, 2003). La perte de ces trois kinases, chez la levure, entraîne un phénotype similaire au mutant *snf1* et abolie l'activité de SNF1. En revanche l'inactivation d'une seule des trois protéines ne provoque pas le phénotype *snf1* et le complexe SNF1 continue à être phosphorylé et fonctionnel (Sutherland *et al.*, 2003). Les protéines homologues, chez les mammifères, à ces kinases de levure sont les protéines LKB1 et la  $\beta$ -isoforme de la protéine kinase Calmoduline dépendante (CaMKK - $\beta$ ).

*LKB1* est connu comme étant un des rares cas de gène muté provoquant une maladie génétique autosomale dominante chez l'humain (syndrome de Peutz-Jeghers) (Hemminki *et al.*, 1998). De nombreuses mutations ont été identifiées chez les patients atteints du syndrome de Peutz-Jeghers. Les patients, atteints de cette maladie, développent de nombreuses tumeurs dans le tractus

gastro-intestinal. *LKB1* est considéré comme un gène répresseur de tumeur. La protéine LKB1 est un complexe constitué par deux sous-unités : la protéine STRAD (Ste20-related adaptator) et la protéine MO25 (Mouse protein-25), chacune possédant deux isoformes ( $\alpha$  et  $\beta$ ) codées par deux gènes différents (Boudeau *et al.*, 2003). L'expression de LKB1 est nécessaire pour activer l'AMPK par l'AICAR et la phenformine dans des cultures cellulaires (Woods *et al.*, 2003). La création de souris KO pour *LKB1* entraîne une létalité embryonnaire (Ylikorkala *et al.*, 2001), suggérant un rôle essentiel de cette protéine au cours du développement. Sakamoto *et al.* (2005) ont utilisé le système Cre-loxP pour créer des mutants conditionnels pour LKB1. Après l'action de la recombinaison Cre, il en résulte une perte totale de l'activité de LKB1 et de son expression dans le muscle squelettique. L'activité de l'isoforme  $\alpha_2$  de l'AMPK ainsi que sa stimulation par contraction, AICAR ou phenformine est entièrement abolie. En revanche, la faible activité initiale de  $\alpha_1$  n'est pas diminuée, ceci étant dû à la présence de cellules autres que musculaires dans l'extrait mais également par la possible existence d'une autre kinase phosphorylant  $\alpha_1$ . Dans le muscle cardiaque, la présence d'une autre kinase phosphorylant  $\alpha_1$  peut être justifiée car une activité de l'isoforme  $\alpha_1$  a été retrouvée dans des isolats de myocytes cardiaques entièrement déficients en protéine LKB1 (Sakamoto *et al.*, 2005).

Des cellules, privées de la protéine LKB1, peuvent avoir une phosphorylation de la Thr172 de la sous unité  $\alpha$  et par conséquent une AMPK active. Cette activation ne se produit pas en présence d'AICAR ou de phenformine mais en présence d'un fort taux en ions  $Ca^{2+}$  dans la cellule. Les CaMKKs, et plus précisément l'isoforme CaMKK- $\beta$ , entraînent une activation de l'AMPK par phosphorylation (Woods *et al.*, 2005). Cependant, l'impossibilité d'activer l'AMPK par l'AICAR ou la phenformine, dans des cellules déficientes en LKB1, suggère que LKB1 est essentielle à l'activation du complexe en réponse à une variation du ratio AMP/ATP. Cela suggère également qu'une variation du taux d'AMP n'est pas suffisante pour activer l'AMPK par la voie des CaMKKs qui sont activées par des concentrations élevées en  $Ca^{2+}$ .

#### 1.2.4.5. Régulation de l'activité de l'AMPK par le glycogène

Des études ont indiqué que le contenu en glycogène musculaire, et donc le statut nutritionnel, pouvait réguler le transport du glucose et l'activité de l'AMPK en réponse à la contraction musculaire. Des rats ayant un contenu en glycogène musculaire faible et élevé ont permis de démontrer qu'au niveau des fibres glycolytiques de type II, la contraction activait le transport du glucose et l'AMPK de façon plus importante chez les rongeurs dont le contenu en glycogène musculaire était faible comparativement au groupe dont le contenu était élevé (Derave *et*



*al.*, 2000). Au niveau des fibres oxydatives de type I, la contraction a induit une augmentation de la captation du glucose et de l'activité de l'AMPK seulement dans les muscles pauvres en glycogène. De plus, l'augmentation du transport du glucose observée en absence d'activation de l'AMPK au niveau des myofibres oxydatives de type I enrichies en glycogène suggère que l'AMPK n'est pas essentielle à la stimulation du transport du glucose par la contraction et qu'une voie indépendante de l'activation de l'AMPK contribue à l'augmentation du transport du glucose dans ce type de muscle. Une étude utilisant des souris transgéniques exprimant une forme dominante négative de la sous-unité  $\alpha_2$  supporte cette dernière conclusion puisque chez ces souris, l'effet de la contraction musculaire *in vivo* et *in vitro* sur le transport est seulement réduit de moitié dans les muscles EDL et soléaire (*in vivo*) (Mu *et al.*, 2001). L'AICAR n'augmente pas la prise de glucose dans le muscle squelettique chez une souris *knock-out* pour le gène *PRKAG3* (*Prkag3*<sup>-/-</sup>), tandis que les effets de la contraction sont préservés. Des souris transgéniques, exprimant la mutation R225Q (Tg-*Prkag3*<sup>225Q</sup>), présentent une augmentation du niveau basal d'activité du complexe AMPK ainsi qu'une augmentation du glycogène musculaire (Barnes *et al.*, 2005).

Tout comme pour la contraction musculaire, la quantité de glycogène musculaire semble dicter l'activation de l'AMPK suite au traitement par l'AICAR *in vivo*. En effet, des résultats démontrent qu'une quantité élevée de glycogène diminue le transport du glucose et l'activation de la sous-unité  $\alpha_2$  au niveau des fibres de type II et de type I chez les rats perfusés *in situ* avec de l'AICAR (Wojtaszewski *et al.*, 2002). L'ensemble de ces travaux suggèrent donc que le glycogène musculaire module l'activation de l'AMPK et le transport du glucose, stimulé par la contraction musculaire ou l'AICAR, mais les mécanismes régulant ces effets demeurent toutefois obscurs.

### 1.3. Famille des gènes bovins de l'AMPK

Le complexe AMPK est fortement étudié chez les mammifères, notamment chez l'homme, la souris, le rat et le porc mais reste peu étudié chez le bovin. McKay *et al.* (2003) ont cartographié chez *Bos taurus* l'ensemble des sept gènes codant les différentes sous-unités du complexe, à l'aide d'hybrides d'irradiation. Le gène *PRKAA1* a été localisé sur le chromosome 20 bovin (BTA 20), les gènes *PRKAA2* et *PRKAB2* sur BTA 3, *PRKAB1* sur BTA 17, *PRKAG1* sur BTA 5, *PRKAG2* sur BTA 4 et *PRKAG3* sur le chromosome 2. Seuls les gènes *PRKAG1* (Benkel *et al.*, 2005) et *PRKAG3* (Yu *et al.*, 2005 ; Roux *et al.*, 2006) ont fait l'objet d'une étude plus détaillée chez le bovin.



## 2. Transformation du muscle en viande.

La viande est le résultat de l'évolution chimique et physique des muscles squelettiques initiée par la mort de l'animal. Elle est principalement composée du tissu musculaire ainsi que du tissu adipeux.

### 2.1. Evolution post-mortem du muscle.

Immédiatement après l'abattage, le muscle est souple. Après la mise en chambre froide des carcasses, les réserves énergétiques stockées sous forme de glycogène s'épuisent rapidement. Le glycogène est transformé en acide lactique qui s'accumule et acidifie le muscle. Les fibres musculaires se figent et le muscle devient rigide. Cette phase de *rigor mortis* dure plusieurs jours. Le muscle est dur et pourrait perdre facilement son eau à la cuisson, ce qui donnerait une viande peu juteuse. L'installation de la rigidité cadavérique est directement perceptible sur la carcasse dans les heures qui suivent la mort de l'animal : la musculature devient progressivement raide et inextensible. Ce phénomène résulte de l'épuisement progressif de l'ATP. En présence d'ATP, les filaments épais (myosine) et les filaments fins (actine) constituant l'appareil contractile peuvent glisser les uns par rapport aux autres, ce qui permet l'extension du muscle lorsqu'une traction est appliquée à ses extrémités, et son retour à sa longueur initiale lorsque la traction cesse : le muscle est donc extensible et élastique. Lorsque le taux d'ATP s'abaisse en dessous d'un certain niveau, généralement de l'ordre de 50 % de la teneur du muscle au repos, correspondant à une valeur de pH de l'ordre de 6, les molécules d'actine et de myosine se combinent en actomyosine. Le glissement relatif des filaments devient impossible et l'ensemble de l'appareil myofibrillaire se transforme en un système rigide : le muscle devient inextensible. Par la suite, la rigidité musculaire s'estompe progressivement, mais pas l'inextensibilité.

Comme tout tissu vivant, le muscle squelettique a un besoin constant en énergie. Au repos, l'énergie est nécessaire à l'homéostasie, c'est-à-dire à la stabilité du milieu intérieur des cellules, grâce en particulier au maintien de gradients de concentration entre celles-ci et leur milieu extérieur, et entre différents compartiments cellulaires. La dépense énergétique augmente considérablement lorsque le muscle remplit sa fonction physiologique : la contraction. Le principal transporteur d'énergie dans la cellule est l'ATP. La synthèse de l'ATP est permise par la dégradation de nutriments comme le glucose, le glycogène, les acides gras. Cet ATP va être utilisé dans la cellule afin d'assurer différents travaux chimiques (biosynthèse), osmotiques (maintien des gradients) ou mécaniques (contraction musculaire). De plus, dans la cellule contractile, deux réactions contribuent à fournir de l'ATP lorsque le besoin s'accroît brutalement, principalement lors de la contraction. Il

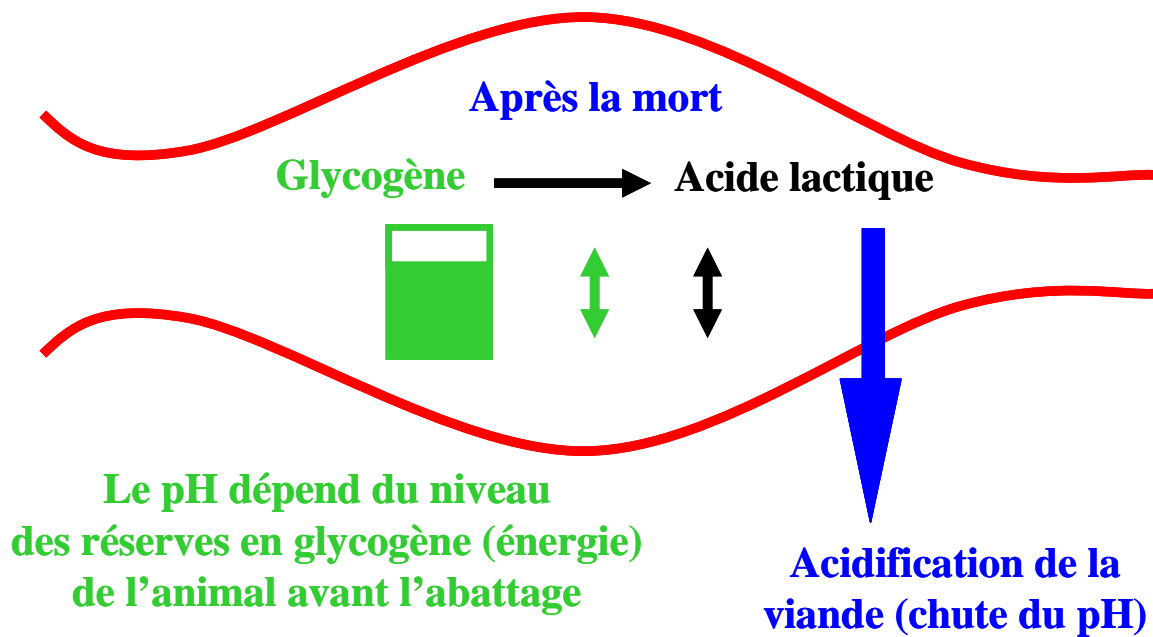


Figure 11 : Schéma d'acidification du muscle après abattage.

Après la mort de l'animal, le glycogène intramusculaire est dégradé pour fournir de l'énergie à la cellule. Cette transformation produit en plus de l'énergie du lactate qui a pour effet d'acidifier le muscle. Le pH final obtenu sera alors dépendant du taux de glycogène initialement présent dans la cellule avant l'abattage.

s'agit d'une part de la dégradation de la phosphocréatine catalysée par l'enzyme créatine phosphokinase, et d'autre part de la réaction catalysée par la myokinase (enzyme spécifique du muscle), qui permet la synthèse de l'ATP grâce à la condensation de deux molécules d'ADP avec formation d'une molécule d'ATP et une d'AMP.

L'abattage entraîne le bouleversement du métabolisme musculaire. L'arrêt de la circulation sanguine interrompt l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules, c'est la fin de l'apport de sources d'énergie extérieures. La privation d'oxygène, ou anoxie, diminue très rapidement leur pouvoir d'oxydation, et seuls les mécanismes anaérobies continuent de fonctionner. Les cellules peuvent encore synthétiser de l'ATP, donc maintenir momentanément leur homéostasie, en mobilisant leurs réserves énergétiques glucidiques, normalement constituées principalement par le glycogène. La phosphocréatine fournit également de l'ATP, mais en plus faible quantité. Bendall (1973) a écrit le bilan des réactions biochimiques de dégradation et de synthèse de l'ATP qui se produisent dans la cellule musculaire immédiatement après la mort. Il distingue deux phases dans ces réactions. Au début, l'ATP dégradé par les nombreuses ATPases musculaires est resynthétisé par la dégradation de phosphocréatine et la glycolyse. Rapidement, la phosphocréatine s'épuise et le taux d'ATP diminue car la glycolyse est une voie de synthèse comparativement peu performante. La synthèse d'ATP par la myokinase intervient alors : c'est la seconde phase des changements biochimiques. L'ensemble de ces réactions conduit à l'accumulation d'acide lactique et de protons à des concentrations sensiblement équivalentes. Ces phénomènes se traduisent par une acidification progressive du muscle (donc une diminution du pH) jusqu'à l'arrêt des processus biochimiques (Figure 11). Le pH se stabilise alors à une valeur appelée pH ultime (pHu). Cette valeur est atteinte suite à l'épuisement de l'AMP (co-facteur de la glycolyse et de la glycogénolyse), ou suite à une carence en phosphocréatine et surtout en glycogène dégradable. L'étude de Charpentier (1968) décrit l'évolution des concentrations musculaires des principaux composés de la glycolyse anaérobie : le glycogène, les sucres réducteurs, l'acide pyruvique et l'acide lactique. La quantité des réserves en glycogène musculaire au moment de l'abattage est estimée grâce au potentiel glycolytique (PG) qui correspond à la quantité de composés glucidiques susceptibles de se transformer en acide lactique lors de la glycogénolyse post-mortem du muscle (Monin et Sellier, 1985). Cette quantité étant exprimée en  $\mu\text{mol}$  d'équivalent acide lactique par g de tissu musculaire frais. Il existe ainsi une forte corrélation négative entre le PG et le pHu (Larzul *et al.*, 1998).

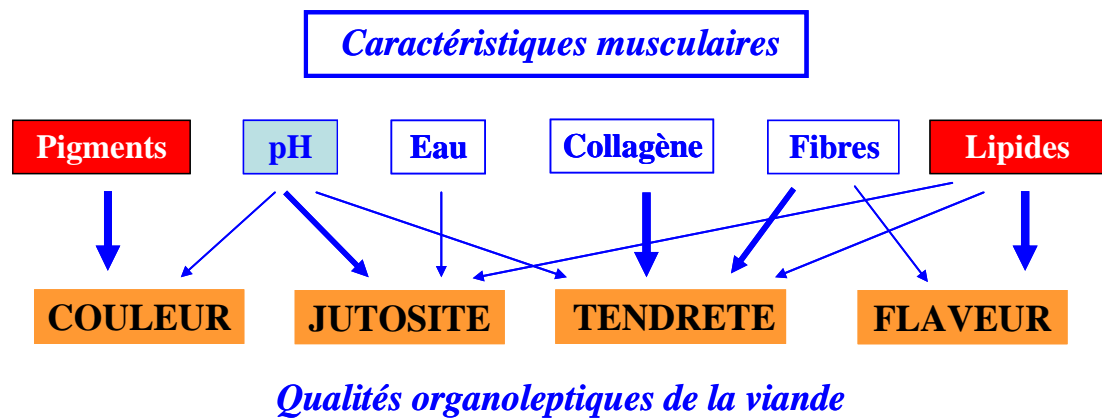


Figure 12 : Relations entre les caractéristiques musculaires et les critères de qualité de la viande (Hocquette *et al.*, 2000).

Les proportions des différentes caractéristiques du muscle sont responsables des propriétés organoleptiques de la viande.

Les relations entre la vitesse de chute du pH et la composition en fibres musculaires sont controversées. Ainsi, aucune différence de pH n'a été observée chez le porc (Lefaucheur *et al.*, 1991) entre les muscles *Longissimus* (blanc) et *Semispinalis* (rouge). D'autres résultats signalent une baisse plus rapide du pH dans les muscles blancs que dans les muscles rouges (Klosowska *et al.*, 1975). Cette controverse s'explique par le fait que, par rapport aux muscles riches en fibres rapides, les muscles riches en fibres lentes ont une activité ATPasique plus faible, ce qui ralentit la vitesse de chute du pH, mais un pouvoir tampon inférieur, ce qui augmente la vitesse de chute du pH (Talmant *et al.*, 1986). Les fibres blanches étant plus riches en glycogène que les fibres rouges, le pH ultime est d'autant plus bas que la proportion de fibres glycolytiques est élevée (Laborde *et al.*, 1985 ; Monin *et al.*, 1987).

## 2.2. Maturation de la viande.

Le muscle est transformé en viande grâce à la maturation. La maturation est un processus naturel d'attendrissement des muscles, qui se met en œuvre après l'avènement de la rigidité cadavérique, dans les 24 ou 48 heures post-mortem. Les modifications qui affectent principalement le compartiment myofibrillaire vont conduire progressivement à une phase de maturation de la viande. Les caractéristiques du tissu musculaire ont une relation avec les qualités organoleptiques de la viande (aspect visuel, tendreté, flaveur, jutosité) (Figure 12). La structure myofibrillaire est profondément remaniée sous l'action de protéines protéolytiques endogènes. L'acidification permet l'activation d'enzymes qui progressivement fragmentent les protéines du muscle et permettent ainsi son attendrissement naturel. C'est la phase de maturation proprement dite : elle correspond à la transformation du muscle en viande, au cours de laquelle se forment également les précurseurs des arômes et de la saveur de la viande. Deux systèmes protéolytiques semblent impliqués dans le processus de maturation post-mortem du tissu musculaire : le système calpaïne/calpastatine et le système cathépsines/cystatines (Ouali, 1991). S'agissant d'un phénomène enzymatique, la vitesse de maturation est fonction de la température mais également du pH du muscle. Chez le bovin, le degrés d'acidité du muscle passe normalement d'un niveau proche de la neutralité, de l'ordre de 7 dans le muscle vivant, à environ 5,5-5,7 dans le morceau de viande ; chez le porc, le pH<sub>u</sub> d'une viande normale est compris entre 5,6 et 6,1. La vitesse de dégradation varie d'une espèce à l'autre, voire même au sein des espèces (Shackelford *et al.*, 1994) : chez le bovin, la valeur finale de pH est atteinte après 24 heures environ alors que chez le porc, le pH se stabilise dans les heures qui suivent l'abattage.

En fonction de l'animal, dans de bonnes conditions de conservation en réfrigération, une à deux semaines sont nécessaires pour que la maturation permette l'expression des qualités organoleptiques recherchées par le consommateur, comme par exemple la flaveur ou la tendreté. La maturation n'a, en revanche, aucun effet sur le collagène, composant du tissu conjonctif qui assure le soutien et la structure du muscle et lui confère sa dureté de base. Les effets bénéfiques de la maturation sur la tendreté seront toujours plus perceptibles pour un muscle pauvre en collagène. Pour un muscle riche en collagène, le choix d'un mode de cuisson approprié permettra d'obtenir les qualités organoleptiques recherchées.

### 2.3. Qualité des viandes.

La structure et la composition physico-chimique du tissu musculaire sont les éléments majeurs qui déterminent la qualité d'une viande. Les facteurs de variation observés en termes de qualité de viande peuvent être expliqués par la race, le sexe et l'âge de l'animal. Les qualités organoleptiques des viandes regroupent les propriétés sensorielles à l'origine des sensations de plaisir associées à leur consommation. Ce sont la couleur, la flaveur, la jutosité et la tendreté. L'appréciation d'un produit par un individu aboutit à la formulation d'un jugement de valeur qui sera pour cet individu « la qualité » du produit sans que cette évaluation soit forcément partagée par tous. Les caractéristiques technologiques et organoleptiques de la viande correspondent à « la qualité » de celle-ci telle qu'elle est perçue de manière directe par le transformateur ou par le consommateur. Au sens large, l'évaluation de la qualité de la viande dépasse pourtant ce cadre puisqu'elle comprend également des aspects sécuritaires (caractéristiques microbiologiques ou toxicologiques) et nutritionnels (teneurs en nutriments). Le terme « qualité » sera plutôt remplacé par « caractéristiques technologiques et organoleptiques ».

#### 2.3.1. Caractéristiques technologiques.

Les caractéristiques technologiques représentent l'aptitude de la viande à la conservation et à la transformation (Monin, 1991).

##### 2.3.1.1. Le pouvoir de rétention d'eau.

Le pouvoir de rétention d'eau ou capacité de rétention d'eau est la capacité qu'a la viande à retenir fermement sa propre eau ou de l'eau ajoutée, et ce lors de l'application d'une force quelconque. Il est primordial de prendre en compte ce paramètre parce qu'il influence la rentabilité du secteur de la transformation et, plus important encore, les qualités organoleptiques de la viande.



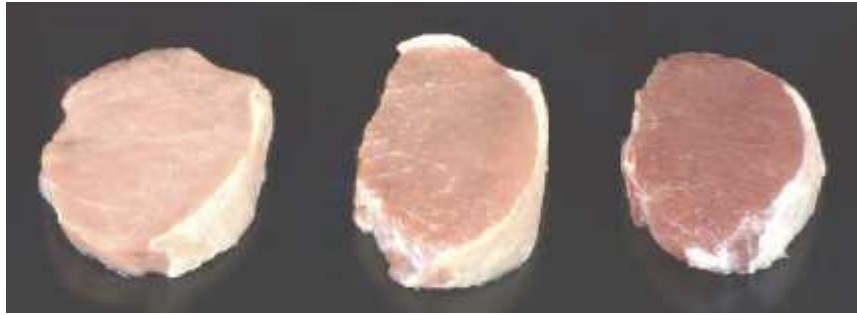
De plus ce paramètre est souvent considéré par le consommateur comme un critère de qualité, voire même, à tort parfois, comme une indication d'un traitement des animaux par des promoteurs de croissance. Il est donc nécessaire de déterminer le pouvoir de rétention d'eau au cours de la conservation (on parle alors de pertes par écoulement) mais aussi au cours de la cuisson (on parle alors de pertes à la cuisson). Il est par ailleurs possible d'estimer le pouvoir de rétention d'eau d'une viande par détermination des pertes de jus lors de l'application d'une force externe sur un échantillon de muscle : la quantité de jus produite est appelée jus expressible.

#### 2.3.1.2. Le pH.

Bien qu'il s'agisse en fait d'un paramètre chimique, le pH est habituellement classé parmi les caractéristiques technologiques parce qu'il influence de façon très importante l'aptitude à la conservation et à la transformation des viandes (Bruce et Ball, 1990). La valeur du pH intramusculaire mesuré *in vivo* est proche de 7. La valeur finale (pH ultime) atteinte influence très fortement l'aptitude à la conservation de la viande : ainsi par exemple, un pH élevé, supérieur à 6, favorise le développement des micro-organismes altérants, responsables d'une altération du goût et de l'odeur de la viande, mais aussi des micro-organismes pathogènes (Monin, 1988). Par ailleurs, un pH élevé entraînera également une modification de la capacité de rétention d'eau et des qualités organoleptiques (Purchas et Aungsupakorn, 1993). La valeur finale est donc liée principalement à un seul facteur : la quantité de glycogène présente dans le muscle avant l'abattage. L'évolution du pH n'est pas homogène dans la carcasse : elle varie d'un muscle à l'autre, voire même d'un endroit à l'autre au sein du même muscle. Ces variations entre espèces et entre muscles sont liées au type métabolique des fibres musculaires.

#### 2.3.2. Caractéristiques organoleptiques.

Ce sont les caractéristiques perçues par les sens du consommateur (Monin, 1991). Tous les sens peuvent être impliqués dans l'évaluation d'une denrée alimentaire : la vue, le goût, l'odorat, le toucher à la main ou dans la bouche, voire même l'ouïe. Le terme de caractéristiques « sensorielles » est également employé (Sauvageot, 1982). En raison même de leur influence directe sur le comportement du consommateur et donc sur l'acceptabilité du produit, les anglo-saxons utilisent également les termes « palatability attributes » ou « acceptability attributes ». Quelle que soit la terminologie utilisée, les différentes caractéristiques sont : la tendreté, la couleur, la jutosité et la flaveur. Ces caractéristiques peuvent être mesurées soit par des méthodes instrumentales, soit par des évaluations sensorielles réalisées par un jury. Le consommateur est particulièrement attentif



A

B

C

Figure 13 : Couleur de la viande.

A. Viande PSE de couleur claire – B. Viande normale – C. Viande DFD de couleur sombre.

aux variations de la qualité des produits qu'il consomme. Lorsqu'elles sont excessives, elles peuvent entraîner un rejet du produit. La viande n'échappe pas à la règle, d'autant plus qu'il n'est pas possible de corriger ces variations par mélange ou homogénéisation. C'est ainsi qu'il est considéré que, parmi les critères de qualité qui peuvent limiter la consommation de viande de boeuf, le plus important est la tendreté (Demeyer et Doreau, 1999). Non seulement le consommateur exige que la viande soit tendre, mais plus encore, qu'elle soit toujours tendre.

#### 2.3.2.1 Couleur.

Chronologiquement, la couleur d'une viande est le premier critère d'appréciation de la viande perçue par le consommateur. Elle le guide pour son choix. Elle dépend fortement de la quantité de myoglobine (Charpentier, 1966). Les différentes fibres musculaires possèdent des teneurs variables en myoglobine suivant qu'il s'agisse d'un muscle à caractère oxydatif (riche en myoglobine) ou à caractère glycolytique (pauvre en myoglobine). La proportion de ces différents types de fibres au sein d'un muscle influence directement sa couleur. La quantité de pigments peut ainsi varier du simple au double entre muscles d'une même carcasse (Renner et Valin, 1979). L'aspect visuel d'une viande dépend également de la structure du muscle réfléchissant la lumière. L'abaissement du pH augmente la quantité d'eau extracellulaire et, en conséquence, la réflexion de la lumière incidente (Offer *et al.*, 1989), ce qui confère un aspect clair aux viandes à bas pH. Dans certains cas, une carence en glycogène musculaire au moment de l'abattage induit un pH élevé (pH > 5,8-6), l'acidification s'arrête trop tôt et la viande reste sombre. On parle alors de viande « a pH élevé » ou « a coupe sombre », la viande est alors rouge foncé (Figure 13C) et sa coupe est dure et ferme, on l'appelle viande DFD pour « dark, firm and dry ». Ces problèmes de viande à pH élevé se rencontrent chez les bovins adultes mais très rarement chez les veaux. Au contraire, une acidification trop rapide du muscle induit une viande pâle, molle et exsudative ou viande PSE (Figure 13A) pour « pale, soft and exudative ». Zamora *et al.* (1996) ont montré chez le bovin qu'une augmentation de la vitesse de chute post-mortem du pH entraîne une diminution de la tendreté du muscle *Longissimus thoracis* après 14 jours de maturation à 4°C. Chez le porc, une vitesse de chute trop rapide du pH est jugée responsable du manque de maturation des viandes PSE et des défauts de tendreté qui en découlent (Minelli *et al.*, 1995). Le consommateur recherche en général une viande ni trop pâle, ni trop foncée, et de couleur homogène.

Les tissus adipeux intermusculaire (marbré) et intramusculaire (persillé) influencent également l'acceptabilité de la viande par le consommateur qui n'apprécie pas une quantité trop importante de gras visible, même si la teneur en lipides intramusculaires améliore les autres composantes de la qualité organoleptique. Une étude réalisée par Fernandez *et al.* (1996) confirme

ce paradoxe : les consommateurs ne souhaitent pas voir de gras dans la viande avant consommation, alors que l'appréciation de la viande après consommation augmente avec le taux de lipides intramusculaires jusqu'à une teneur en lipides comprise entre 2,5 et 3,5 %.

#### 2.3.2.2. Tendreté.

La tendreté de la viande est la facilité avec laquelle la viande est découpée puis broyée lors de la mastication. Elle peut être considérée comme le composant mécanique de la texture de la viande. C'est la qualité la plus appréciée et la plus recherchée par le consommateur. Paradoxalement, la tendreté est souvent exprimée par son contraire : la dureté. Ce paramètre peut facilement être mesuré puisqu'il représente la résistance mécanique lors du cisaillement ou de la mastication. Ce paramètre est très souvent mesuré sur des viandes cuites puisque les viandes non divisées sont consommées le plus souvent après cuisson. La facilité avec laquelle une viande se laisse trancher ou mastiquer, dépend de la quantité, de la répartition et du degré de polymérisation du collagène musculaire, ainsi que de la structure myofibrillaire (Valin, 1988). Le collagène intervient par sa quantité et sa solubilité. C'est un composant musculaire très résistant qui forme l'armature interne et externe des muscles, encore appelé « tissu conjonctif ». Cette armature de collagène confère au muscle sa dureté de base : le morceau est d'autant plus dur que la quantité de collagène est importante et que ce collagène est insoluble. La composante myofibrillaire joue également un rôle prépondérant dans la détermination de la tendreté de la viande. La résistance mécanique n'est pas constante *post mortem*. On distingue habituellement trois périodes. La première précède l'état de rigidité cadavérique, on l'appelle état *pre rigor*, elle est suivie par la rigidité cadavérique (*rigor mortis*) qui devient maximale au bout de quelques heures après l'abattage chez les bovins. Cet état correspond à des valeurs maximales de résistance mécanique que l'on peut mettre en évidence par la mesure de la force maximale de cisaillement c'est à dire la force maximale qui est appliquée au cours d'une épreuve de cisaillement d'un échantillon de viande. La valeur maximale est atteinte 1 à 2 jours après l'abattage. Ensuite, on observe une diminution de la résistance mécanique de la viande correspondant à un attendrissement de la structure myofibrillaire. Cet attendrissement résulte d'une fragilisation de la structure myofibrillaire, elle-même expliquée par une protéolyse partielle de certaines protéines-clés impliquées dans la constitution de la structure des myofibrilles. Cette protéolyse se produit dès l'abattage mais ses effets favorables sur la tendreté sont masqués par le développement de la rigidité cadavérique au cours des 24 premières heures. Les propriétés des myofibrilles dépendent essentiellement de l'évolution *post mortem* du pH et des réactions protéolytiques intervenant pendant la maturation (Valin, 1988). Minelli *et al.* (1995) et Monin *et al.* (1999) ont montré que la vitesse de chute du pH constitue le principal déterminant

de la résistance myofibrillaire et de la dureté de la viande de porc, le pH ultime ayant un effet moins important. La tendreté augmente avec la durée de conditionnement de la viande (Wood *et al.*, 1996).

Pour préciser l'importance relative des différentes caractéristiques biochimiques des muscles sur la tendreté de la viande, Dransfield (1993) a réalisé une étude sur trois muscles donnant des viandes différentes en terme de tendreté (du plus tendre au moins tendre : *Longissimus thoracis* (LT), *Semitendinosus* (ST), *Triceps brachii* (TB)). Il a été montré que les viandes tendres après 14 jours de maturation ont tendance à avoir une faible teneur en collagène total et insoluble, une teneur élevée en lipides, des fibres musculaires de petite taille, un pourcentage faible de fibres rapides oxydo-glycolytiques et un pourcentage élevé de fibres lentes oxydatives. Cependant, l'ensemble de ces variables ne permet d'expliquer qu'une faible part de la variabilité de la tendreté finale de la viande.

#### 2.3.2.3. Jutosité.

La jutosité d'une viande, ou impression de libération de jus, est une caractéristique perçue lors de la mastication. Elle est liée à la quantité d'eau libre subsistante dans la viande et à la sécrétion de salive stimulée essentiellement par les lipides. Elle varie avec le pouvoir de rétention d'eau de la viande, les pertes à la cuisson et la présence de lipides. Le pouvoir de rétention d'eau est une caractéristique de la viande importante à plusieurs titres : aspect du produit cru, perte à la cuisson, jutosité du produit cuit. La part la plus importante de l'eau est retenue par des forces de type capillaire dans le réseau myofibrillaire des cellules musculaires. Trois facteurs modifient le volume myofibrillaire après l'abattage, donc l'espace disponible pour les molécules d'eau (Offer et Knight, 1988). Il s'agit de la diminution du pH, de la fixation des filaments fins (actine) et épais (myosine) lors de l'installation de la rigidité cadavérique et de la dénaturation de la myosine. Le coefficient de corrélation entre le pHu et la jutosité de la viande est évalué à 0,68. Les lipides intramusculaires influenceraient favorablement la jutosité de la viande, le coefficient de corrélation entre le taux de lipides intramusculaires et la jutosité variant selon les études entre 0,21 et 0,65.

#### 2.3.2.4. Flaveur.

La flaveur est un ensemble complexe de sensations perçues par le goût et l'odorat lorsque le morceau de viande est en bouche. La flaveur associe les saveurs et les arômes. Ces perceptions olfactives et gustatives lors de la dégustation sont libérées au moment de la cuisson de la viande à partir de molécules précurseurs d'arômes, contenues notamment dans le gras. Les lipides ont une

incidence sur la consistance du tissu adipeux, composante essentielle de la qualité de ce tissu (Touraille *et al.*, 1989). Plus précisément, c'est le degré d'insaturation des acides gras qui influence la consistance. Un tissu adipeux constitué d'une majorité d'acides gras insaturés sera plutôt mou, et dans le cas contraire il sera ferme. La durée de conservation du tissu est limitée par le développement des réactions d'oxydation des acides gras insaturés qui favorisent une forte teneur en eau et un degré d'insaturation des lipides (Lebret et Mourot, 1998). La teneur en lipides intramusculaires est un facteur primordial concernant la flaveur de la viande, si ce taux est inférieur à la valeur seuil déterminée pour l'espèce concernée, la viande n'est plus caractérisée par une flaveur spécifique (Hocquette *et al.*, 1998). La teneur optimale en lipides intramusculaires pour l'obtention de caractéristiques sensorielles favorables est de 2,5 à 3,0 % dans le muscle *Longissimus* de porc (Fernandez *et al.*, 1995), elle est estimée à 4 % de gras intramusculaire pour le bovin et serait même préjudiciable à la flaveur au delà de 10-15%. Parmi la composante lipidique, un rôle important est attribué aux phospholipides dans le développement de la flaveur caractéristique de la viande cuite (Mottram et Edwards, 1983). En conséquence, la typologie d'un muscle peut influencer la flaveur de la viande en raison des différences de teneur et de composition en phospholipides selon le type métabolique des muscles (Leseigneur-Meynier et Gandemer, 1991). Chez le mouton, Valin *et al.* (1982) ont montré que l'intensité de la flaveur est directement liée au caractère rouge de la viande, en particulier au pourcentage de fibres lentes.

### 2.3.3. Qualité hygiénique.

La qualité hygiénique de la viande constitue l'exigence élémentaire du consommateur. Elle peut être altérée par la prolifération de micro-organismes néfastes et/ou la présence de composés toxiques. La viande peut être contaminée par des microorganismes à différentes étapes de la chaîne de transformation. Le contrôle des proliférations microbiennes dépend avant tout du respect de la chaîne du froid, cependant plusieurs facteurs peuvent également influencer la multiplication microbienne. Ainsi, un pH ultime élevé favorise le développement de bactéries putréfiantes. En conséquence, les muscles riches en fibres rouges lentes, pauvres en glycogène, sont plus exposés aux proliférations bactériennes néfastes.

L'utilisation de certaines molécules en élevage (antibiotiques, facteurs de croissance), qui peut entraîner la présence de résidus dans les viandes, devient une préoccupation grandissante pour le public. L'évolution possible de la demande des consommateurs vers une viande exempte de résidus pourrait avoir des conséquences considérables sur l'ensemble des acteurs de la filière.

#### 2.4. Gènes à effets majeurs sur la qualité de la viande

La qualité de la viande est sous le contrôle d'un grand nombre de paramètres, allant de l'alimentation de l'animal au déterminisme génétique, en passant par l'âge, le stress, les conditions d'abattage, les conditions de stockage et de maturation... Ces caractéristiques dans les différentes espèces animales sont fonction d'un grand nombre de paramètres dont certains sont inhérents à l'animal lui-même et d'autres contrôlés par l'homme comme le mode d'élevage ou la transformation en viande.

Certains gènes, notamment chez le porc, sont considérés comme des gènes majeurs influençant les qualités de la viande : le gène de sensibilité à l'halothane et le gène RN.

Au début des années 70, le test d'anesthésie au gaz halothane a permis une meilleure compréhension du déterminisme héréditaire des viandes pâles et exsudatives (Eikelenboom et Minkema, 1974). Ce test sépare les animaux en deux catégories : les animaux sensibles et les animaux non sensibles. La sensibilité à l'halothane est liée à un déterminisme monogénique (Smith et Bampton, 1977), le gène est désigné HalS (ou n). Cette sensibilité est due à un polymorphisme de type SNP dans le gène codant le récepteur à la ryanodine impliquée dans les mouvements de calcium de la cellule musculaire striée. Cette sensibilité se traduit pour la cellule par une perte de la capacité à contrôler ses flux d'ions calcium ; l'activité ATPasique myofibrillaire est activée de façon durable, ce qui conduit à une intense hydrolyse de l'ATP. Par conséquent, les mécanismes de resynthèse de l'ATP sont très actifs. Cette accélération du métabolisme s'accompagne d'une forte production de chaleur et d'une accumulation d'acide lactique. Ces animaux sensibles montrent une chute rapide du pH, une température musculaire élevée et un établissement précoce de la *rigor mortis* (Monin *et al.*, 1987). Ces phénomènes sont à l'origine de l'apparition du syndrome PSE.

Dans le début des années 90, une mutation génétique entraînant un phénotype nommé RN<sup>-</sup> (Rendement Napole) (Naveau *et al.*, 1985), a été caractérisée grâce à une analyse de ségrégation réalisée dans des lignées de porcs de race Hampshire (Le Roy *et al.*, 1990). Les conséquences de ce défaut n'ont pas été immédiatement comprises, car non seulement aucune pathologie liée à cette mutation n'avait été recensée, mais au contraire, elle favorisait la croissance et la masse musculaire des carcasses. Les éleveurs ont donc préférentiellement sélectionné les animaux porteurs de la mutation RN<sup>-</sup> conduisant ainsi à un accroissement de la fréquence de cet allèle au sein de la population de race Hampshire. Les muscles des animaux porteurs de cet allèle subissent une baisse des rendements industriels notamment lors de l'élaboration de jambons cuits ou salés. Cet effet est dû à un accroissement d'environ 70 % du taux de glycogène dans les muscles squelettiques (Estrade *et al.*, 1993). L'identification et l'élimination de la mutation responsable de ce phénotype devinrent

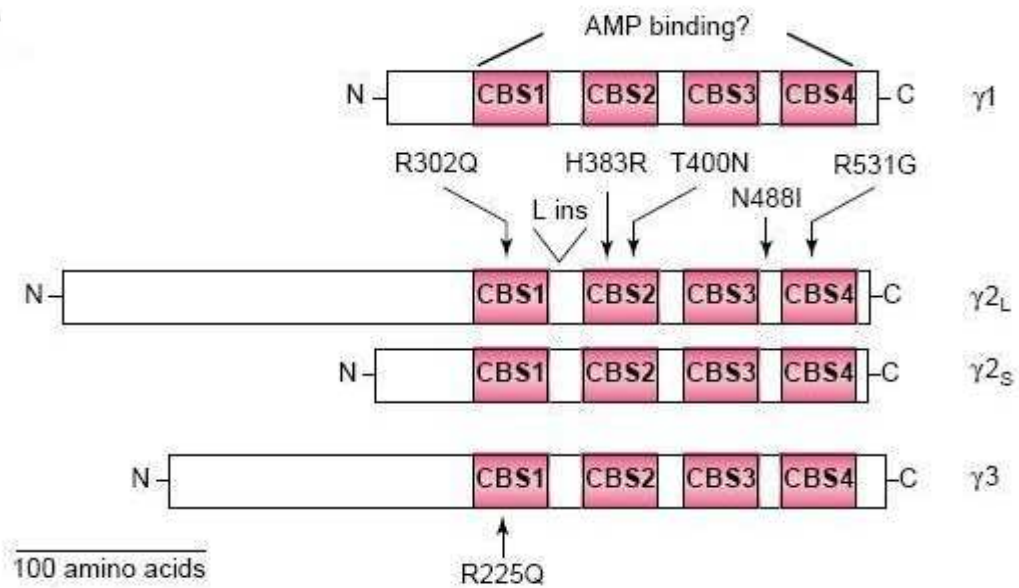


Figure 14 : Représentation schématique des sous-unités  $\gamma$  de l'AMPK avec leurs quatre domaines CBS.

Les principales mutations naturelles connues sont indiquées sur la figure, notamment la mutation responsable du phénotype RN chez le porc ainsi que plusieurs mutations sur la sous-unité  $\gamma_2$  (d'après Carling, 2004).



rapidement une nécessité économique pour les industriels. La mutation RN<sup>-</sup> est située sur le chromosome 15 porcin (Milan *et al.*, 1996). Elle a été identifiée par une technique de clonage positionnel (Milan *et al.*, 2000). Cette mutation concerne le gène *PRKAG3* codant l'isoforme  $\gamma_3$  d'une des sous-unités de la protéine kinase AMP-dépendante (AMPK). L'allèle RN<sup>-</sup> code une protéine où l'Arginine 225 est remplacée par une Glutamine (R225Q). Ce changement en acide aminé (R225Q) intervient au niveau d'un des domaines CBS (domaine CBS1) de la protéine. Il s'agit là de la première mutation naturelle sur l'AMPK entraînant un effet physiologique associé. Des souris transgéniques sur-exprimant la mutation R225Q de la sous-unité  $\gamma_3$  porcine (Tg-*Prkag3*<sup>225Q</sup>) présentent une augmentation du taux de glycogène dans le muscle comparativement à des souris normales ou des souris KO (*Prkag3*<sup>-/-</sup>) pour ce gène. Ceci confirme l'association de la mutation avec le phénotype, et montre qu'il ne s'agit pas d'une mutation perte de fonction (Andersson, 2003). La mutation spécifique du gène *PRKAG3* entraîne une diminution de l'activité de l'AMPK et une augmentation du contenu en glycogène musculaire chez le porc Hampshire (Milan *et al.*, 2000). Il a été suggéré que cette mutation activerait dans un premier temps l'AMPK, ce qui produirait une augmentation du transport du glucose et de la synthèse de glycogène et que l'inhibition subséquente de l'activité de l'AMPK serait secondaire à un mécanisme de régulation négative dû à la synthèse accrue de glycogène (Derave *et al.*, 2000 ; Hamilton *et al.*, 2001). Considérant les résultats de ces deux dernières études, il a donc été suggéré que la sous-unité  $\gamma_3$  serait impliquée dans l'augmentation du contenu en glycogène musculaire dans les myofibres oxydatives observée suite à l'entraînement physique.

Une mutation équivalente à celle présente dans le gène porcin *PRKAG3* existe dans le gène *PRKAG2* (codant l'isoforme  $\gamma_2$  de l'AMPK) humain. Elle se situe à une position correspondante dans le domaine CBS 1 (R302Q) et provoque le syndrome cardiomyopathique de Wolf-Parkinson-White (WPW), une arythmie cardiaque caractérisée par une pré-excitation ventriculaire, dans laquelle le délai normal de contraction entre l'oreillette et le ventricule est réduit (Gollob *et al.*, 2001). Les patients atteints d'un tel phénomène, présentent de fréquents troubles du rythme cardiaque et peuvent décéder d'un arrêt du cœur à un âge relativement précoce. Des études employant un modèle de souris transgéniques (Arad *et al.*, 2003) suggèrent que les arythmies peuvent être provoquées par un stockage élevé de glycogène dans le muscle cardiaque. D'autres mutations ont été identifiées pour cette sous-unité  $\gamma_2$  chez l'homme (Figure 14). Une, plus critique, a été identifiée, comme la mutation R531Q, responsable d'une léthalité néo-natale précoce. Les cœurs sont plus gros, avec à l'intérieur une quantité plus importante de glycogène et une organisation myofibrillaire modifiée.

Une étude fonctionnelle utilisant la kinase de levure Snf1-Snf4 suggère que cette mutation donne une kinase constitutivement active (Arad *et al.*, 2002), de même que la mutation R70Q dans l'isoforme  $\gamma 1$  humaine (Hamilton *et al.*, 2001).

Ces différentes mutations se produisant dans un des domaines Bateman, ou plus précisément dans l'une des régions CBS, des différentes sous-unités  $\gamma$  associées aux caractères phénotypiques précédemment décrits suggèrent une variation de la fixation de l'AMP au niveau des ces domaines ainsi qu'une variation dans l'activation du complexe  $\alpha\beta\gamma$  par l'AMP. Les domaines Bateman ont également la capacité de lier l'ATP (avec moins d'affinité que l'AMP). Ceci va dans le sens qu'une forte concentration en ATP est capable d'inhiber les effets activateurs de l'AMP sur l'AMPK.

La qualité d'une viande est déterminée par le métabolisme musculaire puisque celui-ci gère les caractéristiques biochimiques du muscle. Ces différentes mutations dans les sous-unités  $\gamma$  montrent leur importance au niveau de la régulation. Chez le porc, la mutation RN<sup>-</sup> est associée à un taux élevé de glycogène. De plus, les animaux porteurs de cette mutation produisent des pertes en eau plus importantes lors de l'élaboration des jambons. Chez le bovin, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude sur ce sujet. La connaissance de la sous-unité régulatrice de l'AMPK au niveau de muscle semble être importante pour le domaine de l'industrie de la viande bovine. Outre cet intérêt appliqué, la connaissance fondamentale de cette enzyme est essentielle pour comprendre les différents mécanismes de régulation métabolique.

# *Matériels & Méthodes*



## 1. Matériel biologique

### 1.1. ADN génomique

Les échantillons d'ADN génomique utilisés pour le séquençage et la recherche de SNP sont issus d'animaux de race Limousine, Charolaise et Angus.

Le génotypage des polymorphismes a été réalisé sur animaux de race Limousine et Charolaise (programme GemQual) ainsi que sur des animaux de race Chianina (collaboration avec l'Université de Pise, Italie).

Les échantillons d'ADN génomique utilisés pour les études d'association ont été prélevés sur des veaux de race Holstein en collaboration avec l'équipe du Dr A. Ouali (INRA, Clermont-Ferrand/Theix), le centre de sélection MIDATEST (Toulouse) et les abattoirs Spangherro (Castelnaudary).

### 1.2. Tissus

Les tissus utilisés pour les extractions d'ARN et protéiques sont issus d'individus de race Limousine et Charolaise. Des parties du cerveau, du coeur, du foie, de la rate, des reins, des testicules ainsi que différents muscles squelettiques (diaphragme, *Longissimus Dorsi*, *Rectus Abdominis*, *Semi Tendinosus*) ont été prélevés immédiatement après l'abattage, découpés en petit morceaux, congelés dans de l'azote liquide et enfin conservés à -80°C. Les animaux ont été abattus à l'abattoir expérimental du centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix.

### 1.3. Anticorps

Quatre anticorps ont été utilisés contre la protéine PRKAG3. Un anticorps polyclonal reconnaissant la protéine murine, gracieusement fourni par la société Arexis (Uppsala, Suède), reconnaissant le motif ISVGEALRRRTLCLLEG situé dans la région N-terminale de la protéine. Un anticorps commercial polyclonal généré grâce à un peptide synthétique sélectionné dans la région N-terminale de la protéine humaine (Abgent). Ainsi que deux sérums polyclonaux de lapin, générés par le Dr A. Ouali (INRA, Clermont-Ferrand/Theix), contre deux formes de la protéine  $\gamma 3$  bovine. Les deux sérums de lapin, Anti-Ex1.Ex2 et Anti-In1.Ex2, sont dirigés contre des peptides de la protéine bovine correspondant l'un au produit de traduction de la fin de l'exon 1 et du début de l'exon 2 (NH<sub>2</sub>-KYEHALCGTPSWSSK-COOH), l'autre à celui de la fin de l'intron 1 (NH<sub>2</sub>-KYLCGSLFSTQTPSK-COOH).

Un anticorps commercial a été utilisé contre la protéine PPAR $\gamma$  (Calbiochem).

Un anticorps polyclonal de lapin a été généré contre la protéine chimère PPARG- T-SEN2 bovine. Le sérum de lapin, Anti-Chim, est dirigé contre un peptide de la protéine bovine H2N-CYFGKGILSRSPNFT-CONH2 (Eurogentec, Liege, Belgique).

Pour la révélation, un anticorps secondaire porc anti-lapin couplé à la peroxydase (POD) (DAKO) a été utilisé.

Lors de la production de protéine recombinante, un anticorps anti-Histidine couplé à la peroxydase (DAKO) a été utilisé.

#### 1.4. Lignées cellulaires

Deux lignées cellulaires ont été utilisées. Une lignée nommée COS7, correspondant à des cellules de rein de singe vert de Madagascar transformées par SV40, et une lignée embryonnaire rénale humaine, nommée HEK 293.

#### 1.5. Vecteurs

Cinq types de vecteurs ont été utilisés : le vecteur pCR 2.1-TOPO pour le clonage des produits PCR (Invitrogen), les vecteurs pET 3a et pET 3d (Novagen) pour le clonage des ADNc codant les différentes sous-unités de l'AMPK, le vecteur pcDNA 3.1 (Invitrogen) et le vecteur pCAGGS (fourni par Yu et Goodyear) pour la production en cellules eucaryotes et le vecteur pIVEX 2.4 (Roche) pour la production in-vitro. Le crible de sélection utilisé est l'ampicilline.

Les BAC (Bacterial Artificial Chromosome) utilisés pour le travail de thèse sont issus de la banque de BAC bovine disponible au Centre de Ressources Biologiques en Génomique Des Animaux Domestiques d'Intérêt Economique (CRB GADIE, INRA, Jouy-en-Josas).

## 2. Méthodes relatives aux acides nucléiques

### 2.1. Préparation d'ADN plasmidique

#### 2.1.1. Mini-préparation et midi-préparation d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est purifié en petite quantité avec le kit « High Pure Plasmid Isolation » (Roche) et en quantité plus importante avec le kit « HiSpeed™ Plasmid Purification » (QIAGEN). Le principe de ces kits est basé sur une lyse alcaline suivie d'une rétention de l'ADN plasmidique sur une résine échangeuse d'anions. L'ADN après purification est conservé à -20°C.

#### 2.1.2. 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 (Jeon *et al.*, 2001). Un ml d'une préculture estensemencé dans un volume de 50 ml de milieu LB (Luria Bertoni) ayant une concentration finale de 12,5 µg/ml en chloramphénicol, pendant une nuit à 37°C avec agitation (250 rpm). La culture est centrifugée à 5000 g pendant 30 min. Le culot bactérien est repris dans 2 ml de solution I (50 mM de glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 8) et les bactéries sont lysées par l'addition de 4 ml de solution II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Après 2 min de lyse à température ambiante, 3 ml de solution III (acétate de potassium 5 M, acide acétique glaciale) sont ajoutés. Après homogénéisation, les tubes sont incubés 30 min dans la glace et centrifugés 20 min à 5000 g et à 4°C. Le surnageant est prélevé et filtré sur de la gaze stérile et peut-être conservé à -20°C pendant plusieurs mois. L'ADN est ensuite précipité à l'isopropanol (750 µl de surnageant + 450 µl d'isopropanol) et récupéré par centrifugation pendant 15 min à 15000 g. Le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol 70%. Après séchage, le culot est repris dans 40 µl de tampon TE/RNase A (20 µg/ml final). Afin de resuspendre l'ADN, les tubes sont incubés à 37°C pendant 10 min.

### 2.2. Préparation d'ADN

#### 2.2.1 Extraction d'ADN génomique total à partir de muscle

L'extraction et la purification de l'ADN génomique sont réalisées à partir d'un échantillon de muscle bovin. Le tissu (environ 500 mg) est haché à l'aide d'un scalpel puis repris dans un tampon de digestion (Tris HCl pH8 10 mM, NaCl 10 mM, EDTA 25 mM, urée 8 M, protéinase K 0,15 µg/ml) à raison de 6 ml pour 1 g d'échantillon. Cet homogénat est incubé à 56°C pendant 12 à 18 h afin d'éliminer les protéines présentes. Après une extraction au phénol-chloroforme [½ volume de phénol, ½ volume de chloroforme/alcool isoamylique (24/1)], l'ADN est précipité à l'éthanol absolu en présence de NaCl 250 mM final et repris dans un volume approprié d'eau.

### 2.2.2. Extraction d'ADN génomique à partir de sang

L'extraction et la purification de l'ADN génomique sont réalisées à partir de 5 ml de sang avec EDTA, préalablement congelé à -20°C. Le sang est décongelé lentement dans la glace, puis dilué dans 4 volumes de TE 20/5 froid et incubé dans la glace pendant 15 minutes. Après centrifugation 20 minutes à 4°C et 4000 rpm, le culot est remis en suspension dans 15 ml de TE 20/5, suivi par une nouvelle centrifugation de 15 minutes. Le culot est ensuite lavé plusieurs fois jusqu'à ce qu'il devienne translucide, puis il est repris dans ½ volume de sang de départ de TE 20/5, complétementé par 1% final de SDS, et 200µg/ml final de Protéïnase K. Cet homogénat est incubé à 65°C pendant 2 heures. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol absolu en présence de NaCl 250 mM final et repris dans un volume approprié d'eau.

### 2.3. Préparation d'ARN totaux

Les échantillons de muscle, conservés à -80°C, sont broyés dans le réactif TRIZOL, un composé phénolique, à l'aide d'un polytron (ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA®-WERKE). Les ARNs sont extraits à partir de la phase aqueuse selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) dont le protocole est fourni avec le réactif TRIzol™ de « Life Technologies ». La solution d'ARN totaux ainsi obtenue est aliquotée et conservée à -80°C.

La qualité et la quantité des ARN extraits sont contrôlées grâce à la méthode développée par Agilent Technologies. Les échantillons d'ARN sont traités avec le kit RNA 6000 Nano, déposés sur une puce Agilent RNA 6000 Nano LabChip et analysés avec un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### 2.4. Méthodes basées sur la réaction en chaîne de polymérisation (PCR)

Les amorces utilisées au cours de ce travail de thèse sont répertoriées en Annexe 1.

#### 2.4.1. Réaction de PCR (classique, Touchdown)

La technique d'amplification de l'ADN par la technique de PCR (Saiki *et al.*, 1988) permet l'amplification, selon un mode exponentiel du nombre de copies 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.



Les PCR sont réalisées dans un volume final de 20 µl. Pour chaque réaction, on trouve dans le tube 30 ng d'ADN en moyenne, 10 pmol de chaque oligonucléotide, 0,5 U de Taq polymérase en moyenne, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et enfin 1X de tampon fourni avec la Taq polymérase. La Taq polymérase utilisée dans ce travail de thèse est la UptiTherm Taq Polymérase (Interchim). Jusqu'à 10 % de DMSO peut être ajouté dans le cas d'amplification de régions riches en nucléotides GC. La réaction classique est constituée de 3 étapes : une étape de dénaturation thermique (96°C, 3-4 min), une étape d'amplification de l'ADN pendant 35 cycles en moyenne (96°C, 30s pour la dénaturation thermique ; 55°C, 30s pour l'hybridation des amorces ; 72°C, 1min pour l'élongation) et une étape de terminaison de la synthèse d'ADN (72°C, 5min). Ce programme peut-être modifié notamment en fonction des amorces utilisées (température d'hybridation), de la taille de l'amplifiat (temps d'élongation) et de la Taq polymérase utilisée (température d'élongation).

D'autres types de méthodes peuvent être utilisés comme la méthode « Touchdown ». Cette méthode comporte une étape de dénaturation thermique et de terminaison de la synthèse d'ADN identiques, par contre l'étape d'hybridation des amorces est un peu différente. En effet, les 30 cycles d'élongation classiques seront précédés de 7 cycles avec une diminution de 1°C de la température d'hybridation à chaque cycle, ceci permettant d'augmenter la spécificité d'hybridation des amorces.

#### 2.4.2. RT-PCR

Afin de générer des fragments d'ADN complémentaire double brins à partir des ARN totaux, une transcription inverse est réalisée avec le kit « SuperScript™ II Reverse Transcriptase » (Invitrogen). Ensuite, 1 à 2 µl de la solution ainsi obtenue d'ADNc sont utilisés pour une PCR suivant une méthode adéquate à l'amplification recherchée (classique, « Touchdown », long fragments).

#### 2.4.3. RACE-PCR (Rapid Amplification cDNA End's-PCR)

La technique de RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) permet d'amplifier les extrémités 5' et 3' des ADNc d'intérêt. Des ARN totaux ou messagers sont traités avec le kit « SMART™ RACE cDNA Amplification » kit (Clontech), selon les instructions du fabricant.

#### 2.4.4. PCR quantitative

La PCR quantitative consiste à comparer le nombre de transcrits d'au moins deux échantillons. Un échantillon sert de référence et la quantification des autres sera faite relativement à cette référence. La quantification repose sur la phase exponentielle d'amplification, au moment où le signal sort du bruit de fond et est significatif. Ce moment correspond à un certain nombre de cycles et est appelé Ct (Threshold Cycle). Pour deux quantités initiales différentes, on obtiendra deux Ct différents. Un gène calibreur (*GAPDH*) est utilisé à chaque fois. Ce gène, dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes situations biologiques, permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADNc dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression. Le taux d'expression du gène d'intérêt est déterminé par rapport à ce gène calibreur. La comparaison de l'expression des gènes entre les deux situations biologiques est obtenue par le calcul :

$$[2^{-(\text{Ct gène d'intérêt échantillon 1} - \text{Ct gène d'intérêt échantillon 2})}] / [2^{-(\text{Ct gène référence échantillon 1} - \text{Ct gène référence échantillon 2})}]$$

Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un appareil 7900 HT (Applied Biosystems). Chaque échantillon est analysé en triplicat. Le programme d'amplification est de 10 min à 95°C (dénaturation) suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C puis 1 min à 65°C (hybridation et élongation respectivement).

##### 2.4.4.1. Quantification par chimie Taqman

Le principe repose sur la fonction exonucléase 5' -> 3' de la Taq polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique d'un fragment interne de la séquence à amplifier, elle est marquée en 5' par un fluorochrome appelé « reporter » et en 3' par un fluorochrome appelé « quencher ». Si la sonde est dégradée par l'activité exonucléasique de la Taq, les fluorochromes ne sont plus reliés entre eux et le signal de fluorescence exprimé par le reporter sera augmenté. L'augmentation du signal est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

La réaction est réalisée à l'aide du kit « Taqman<sup>®</sup> 2X PCR Master Mix » (Applied Biosystems) dans un volume final de 20 µl.

##### 2.4.4.2. Quantification par SYBR Green

Les analyses sont réalisées en utilisant le fluorochrome SYBR Green I (1X SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)), un intercalant fluorescent de l'ADN double brin. Contrairement à la chimie Taqman, il n'est nul besoin de concevoir une sonde. En contre partie, la fluorescence mesurée peut provenir de produits d'amplification non spécifiques.

Pour chaque gène d'intérêt, un couple d'oligonucléotides est choisi grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer). Ces différents couples d'amorces doivent être validés expérimentalement. Dans un premier temps, on recherche la concentration optimale en amorce. Trois concentrations en oligonucléotides (50, 300 et 900 nM) sont donc testées afin de déterminer la concentration qui donne le meilleur signal de fluorescence. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl d'ADN à 5 ng/µl, de 10 µl de Mix SYBR Green et de 1 µl d'amorces sens et antisens à 7,5 µM pour une concentration finale de 300 nM. L'étape suivante consiste à vérifier la relation entre le nombre de cycles (Ct) nécessaire pour que le signal de fluorescence atteigne une valeur seuil et le logarithme de la concentration en ADN matrice. Cinq dilutions successives au ¼ de l'ADN matrice sont réalisées. Pour une efficacité de PCR à 100%, la pente de la droite Ct en fonction de  $\log_{10}$  de la concentration en ADN matrice doit être égale à  $-3,32$ . Lorsque toutes ces vérifications préliminaires sont réalisées, on analyse les échantillons d'intérêt.

## 2.5. Electrophorèse d'acides nucléiques et purification

### 2.5.1. Electrophorèse en gel d'agarose

Les analyses se font par électrophorèse en gel d'agarose (dont la concentration varie en fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés) contenant du Bromure d'Etidium (BEt 0,5 µg/ml). Le tampon utilisé est du TBE (Tris-borate pH 8,0 89 mM, EDTA 2 mM pH 7,5). La migration s'effectue à 10 V/cm de gel environ. L'échantillon d'ADN auquel est ajouté du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, glycérol 40 %) est déposé sur gel. Un marqueur de taille approprié, comme par exemple le 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), est déposé en regard des échantillons et permet ainsi d'estimer la taille des fragments d'ADN.

### 2.5.2. Purification des fragments d'ADN après séparation sur gel d'agarose

Le système d'extraction commercial « QIAquick gel extraction Kit » (Qiagen) a été utilisé pour la purification de fragments de 40 pb à 10 kpb. Son principe repose sur l'adsorption de l'ADN sur une colonne de silice.

## 2.6. Clonage de fragments d'ADN

Le clonage consiste à insérer un fragment d'ADN dans un vecteur qui est ensuite introduit dans une cellule hôte. Le clonage est composé de deux étapes : une étape de ligature (ligature de produits PCR ou de fragments d'ADN à extrémités cohésives) permettant l'introduction du

fragment d'ADN dans un vecteur et une étape de transformation consistant en l'introduction du vecteur dans la cellule hôte.

## 2.6.1. Ligature

### 2.6.1.1. Ligature par Topoisomérase

Le clonage de produits PCR a été effectué grâce au système pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). Le principe repose sur le fait que la Taq polymérase ajoute des nucléotides A à chaque extrémité 3'OH du produit d'élongation. Le vecteur utilisé ici possède des nucléotides T à chaque extrémité 5' améliorant ainsi l'efficacité de clonage des produits PCR. La ligature se fait en présence de salt solution à température ambiante selon les instructions du fabricant.

### 2.6.1.2. Ligature des extrémités générées après digestion par des enzymes de restriction

En ce qui concerne le clonage de fragments d'ADN dans les autres vecteurs, le vecteur et le fragment d'ADN à insérer sont préparés par digestion par des enzymes de restriction dans le but de présenter des extrémités compatibles. Une seule ou deux enzymes de restriction différentes peuvent être utilisées. L'utilisation de deux enzymes de restriction différentes permet le clonage directionnel. Les sites de clivage des enzymes de restriction sont soit présents sur le fragment soit introduits sur les amorces, utilisées lors de l'amplification du fragment, permettant leur addition à chaque extrémité du fragment. Lorsque le vecteur est ouvert avec une seule enzyme de restriction, ses extrémités 5' sont désphosphorylées, pour éviter une recircularisation. Les ligatures sont pratiquées dans un volume total de 20 µl contenant 50 ng de vecteur désphosphorylé, un 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 MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP 10% PEG) et 2 µl d'enzyme T4 DNA Ligase (Promega). Ce mélange réactionnel est laissé toute la nuit à une température de 15 °C. Les vecteurs utilisés pour la ligature d'extrémités à bords cohésifs sont les vecteurs pET 3a et pET 3d (Novagen), et le vecteur pcDNA 3.1 (Invitrogen).

## 2.6.2. Préparation de bactéries compétentes

Afin de pouvoir faire pénétrer à l'intérieur de la cellule une molécule d'ADN double brin, il faut rendre ces cellules compétentes. La méthode utilisée est celle décrite par Mandel et Higa (1970). 500 ml de milieu de culture LB sontensemencés à partir d'une pré-culture en phase

stationnaire. Quand la « turbidité » de la suspension atteint 0,6 unités de DO à 600 nm, les cellules bactériennes sont récoltées par 5 minutes de centrifugation à 5000 g. Le culot cellulaire est resuspendu dans 250 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM froid. La suspension est laissée 20 minutes en incubation dans la glace avant d'être centrifugée 5 minutes à 5000 g. Le culot est repris dans 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, 15% glycérol. Les cellules sont laissées 24 heures à 4°C ce qui permet d'augmenter de 4 à 6 fois l'efficacité de la transformation (Dagert et Ehrlich, 1979). Les cellules rendues ainsi compétentes sont divisées en fraction de 200 µl, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C. La compétence de ces cellules est maintenue durant au moins six mois.

### 2.6.3. Transformation bactérienne

Les bactéries dites compétentes ont subi un certain nombre de traitements chimiques qui les rendent aptes à internaliser un acide nucléique étranger. Deux souches de bactéries ont été utilisées, les bactéries *E. coli* DH5α (Invitrogen ou préparées) et la souche *E. coli* BL21 (Novagen).

Une suspension bactérienne est décongelée et incubée dans la glace 30 min en présence de 2 à 5 µl d'un mélange de ligature. Le choc thermique s'effectue à 42°C pendant 45 secondes. Puis les bactéries sont de nouveau placées dans la glace 3 min. Du milieu LB (250 µl) est ajouté à la suspension, et le mélange est incubé 1 h à 37°C sous agitation (250 rpm). La totalité de la suspension est alors étalée sur un milieu de culture LB, supplémenté en antibiotique adéquat (Ampicilline 100 µg/ml), et incubée à 37°C pendant 12 h.

## 2.7. Séquençage

### 2.7.1. Séquençage selon la méthode de Sanger

Les séquences de fragments d'ADN sont déterminées selon la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les réactions de séquençage de produits de PCR purifiés après séparation sur gel d'agarose ou d'ADN plasmidique purifié, sont menées grâce à l'utilisation d'une enzyme thermostable. Elles nécessitent 200 à 400 ng de matrice, un mélange réactionnel commercial (BigDye Terminator v3.1, Applied Biosystems) contenant les dNTPs, les ddNTPs, le MgCl<sub>2</sub> et l'ADN polymérase, ainsi que 15 pmol d'amorce. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation à 96°C pendant 10s, hybridation de l'amorce à 55°C pendant 5s et élongation à 60°C pendant 4 min. L'ADN néosynthétisé est précipité et lavé sur colonnes de Sephadex G50, afin d'éliminer les réactifs non utilisés qui pourraient perturber la migration. Le culot d'ADN est ensuite séché et repris dans 10 µl de formamide. Les produits sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique (ABI Prism 3130 Genetic Analyser, Applied Biosystems).

### 2.7.2. Séquençage direct sur BAC

Après purification de l'ADN de BAC, une digestion sur la nuit de l'ADN de BAC par l'enzyme de restriction *EcoRV* est réalisée et les fragments d'ADN obtenus sont purifiés avec le kit QIAEX II (QIAGEN). L'ADN est ensuite précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes d'éthanol 95% pendant 30 min à  $-20^{\circ}\text{C}$ , et centrifugé à  $4^{\circ}\text{C}$  à 13000 g pendant 20 min. Le culot est lavé avec 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol à 70%, puis séché et repris dans 10  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  stérile. Pour la réaction de séquençage, 5  $\mu\text{l}$  de la solution contenant les fragments de BAC sont mélangés avec 8  $\mu\text{l}$  de mélange réactionnel (BigDye sequencing kit v1.1, Applied Biosystems) et 15 pmol d'amorce. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation à  $96^{\circ}\text{C}$  pendant 30 s, hybridation de l'amorce à  $50^{\circ}\text{C}$  pendant 10 s et élongation à  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 4 min. L'ADN ainsi néosynthétisé est ensuite précipité et lavé comme décrit ci-dessus.

### 2.8. Recherche de polymorphismes de type SNP par la technique SSCP

La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est basée sur l'analyse du changement de mobilité électrophorétique de l'ADN simple brin, qui est lié à des modifications de la structure secondaire ou tertiaire de l'ADN en cas de mutation. La mobilité électrophorétique de fragments d'ADN issus d'individus différents est comparée. L'existence d'un ou plusieurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) est vérifiée par séquençage des individus présentant un profil électrophorétique différent après coloration au nitrate d'argent.

#### 2.8.1. Préparation des échantillons et des standards.

Les régions d'intérêt sont amplifiées par PCR de manière à ce que la taille des fragments résultants n'excède pas 500 pb. Les échantillons sont dilués dans du 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 et dénaturés 5 min à  $95^{\circ}\text{C}$ . Le marqueur de taille (Amersham Biosciences) de 100 pb est aussi dilué avec le tampon de charge et placé en regard des échantillons.

#### 2.8.2. Electrophorèse et coloration au nitrate d'argent

Le gel précoulé (gels GeneGel SSCP, Amersham Pharmacia Biotech.) est réhydraté pendant 1 heure avec 15 ml d'un tampon adéquat (GeneGel SSCP Buffer A, B ou C, Amersham Pharmacia Biotech.). Les échantillons et le marqueur de taille sont ensuite chargés dans les puits et la migration est réalisée grâce à un appareil d'électrophorèse nommé « GenePhor Electrophoresis

Unit ». Les conditions de migration dépendent du tampon 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 puissance 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

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), selon les instructions du fabricant.

## 2.9. Génotypage de SNP

### 2.9.1. Méthode Taqman<sup>®</sup>

La réaction est réalisée à l'aide du kit « Taqman<sup>®</sup> 2X PCR Master Mix » (Applied Biosystems) et consiste en une amplification par PCR de la région d'intérêt. La particularité de cette réaction est la présence, en plus des amorces, de deux sondes, marquées en 5' par deux fluorochromes différents, reconnaissant chacune spécifiquement l'un des deux allèles du SNP d'intérêt. En 3' des sondes se trouve un « quencher » qui empêche l'émission de fluorescence. La polymérase, en progressant, va dégrader les sondes hybridées spécifiquement. L'absence du « quencher » à proximité du fluorochrome va permettre la libération de la fluorescence allèle-spécifique. Après la réaction d'amplification, l'intensité de fluorescence est mesurée par l'appareil « Taqman<sup>®</sup> 7900 HT » (Applied Biosystems). Pour exemple, considérons les allèles 1 et 2 couplés aux fluorochromes rouge et bleu, respectivement. Dans le cas d'un individu homozygote pour l'allèle 1 ou l'allèle 2, on aura libération exclusivement de fluorescence rouge ou bleue, respectivement. Dans le cas d'un individu hétérozygote, il y aura une libération équivalente de fluorescence rouge et bleue.

### 2.9.2. Méthode Amplifluor

Le principe de réaction de la méthode Amplifluor (Chemicon) est similaire à la méthode Taqman<sup>®</sup> décrite précédemment. Il est basé sur le principe de la PCR compétitive allèle spécifique. Les amorces utilisées pour l'amplification sont allèles spécifiques et possèdent à leurs extrémités 5' une séquence spécifique, sur laquelle va venir s'hybrider une deuxième amorce spécifique de la première repliée en épingle et possédant des fluorochromes différents, reconnaissant chacun

spécifiquement l'amorce amplifiant l'un des deux allèles du SNP d'intérêt. En 3' des sondes se trouve un « quencher » qui empêche l'émission de fluorescence. La polymérase en progressant va dérouler l'épingle et l'absence du « quencher » à proximité du fluorochrome va permettre la libération de la fluorescence allèle-spécifique. La réaction PCR se compose, comme une réaction PCR classique, de 0,5 U de Taq polymérase, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM de chaque dNTP et 1X de tampon fourni avec la Taq polymérase, auquel on rajoute 2 amorces spécifiques du SNP (250 μM), 2 amorces allèle spécifique fluorescentes (25 μM) ainsi qu'une amorce reverse commune (375 μM). La réaction se fait dans 10 μl final avec 5 ng d'ADN. Après la réaction d'amplification, l'intensité de fluorescence est mesurée par l'appareil « Taqman<sup>®</sup> 7900 HT » (Applied Biosystems).

### 2.9.3. Méthode par longueur de fragment

Le principe du génotypage repose sur l'analyse de la taille d'un fragment amplifié grâce à des amorces, dont une est marquée par un fluorochrome, flanquants le polymorphisme étudié. La taille du produit d'amplification varie donc en fonction du nombre de répétitions, celui-ci étant spécifique de chaque allèle. L'analyse est réalisée sur le séquenceur « ABI PRISM 310 Genetic Analyzer » (Applied Biosystems). Les fragments d'ADN marqués sont excités par un laser et émettent une fluorescence qui sera collectée par l'appareil. En fonction de l'intensité de fluorescence, le logiciel interprète et « positionne » un pic électrophorétique. La taille exacte du fragment est estimée par rapport aux différents pics du marqueur de taille, migrant en même temps que l'échantillon à analyser.

Le fragment d'intérêt a été amplifié par PCR « Touchdown » avec une amorce sens marquée avec le fluorochrome 6-FAM<sup>™</sup> (longueur d'onde d'émission : 517 nm, longueur d'onde d'excitation : 494 nm) et une amorce anti-sens non marquée.

La première étape consiste en la constitution des matrices, permettant de calibrer l'appareil, à l'aide du kit « DS-30 Matrix Standard kit ». La seconde étape consiste en la préparation des échantillons. Pour cela, on prélève 1 μl de chaque échantillon auquel sont ajoutés 12 μl de Formamide Hi-di et 0,5 μl de marqueur de taille GeneScan-500 LIZ<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Ce marqueur de taille, couplé à un fluorochrome orange, 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. Après dénaturation, chaque échantillon est analysé avec le système GeneScan ABIPrism<sup>®</sup> 310 (Applied Biosystems).



### 3. Méthodes relatives aux protéines

#### 3.1. Préparation des échantillons protéiques

L'extraction est réalisée selon la méthode fournie par A. Ouali (INRA, Clermont-Ferrand, Theix), sur des échantillons de tissus conservés à -80°C. Ceux-ci (400 à 600 mg) sont broyés au polytron (ULTRA-TURRAX<sup>®</sup> T25 basic IKA<sup>®</sup>-WERKE) dans trois volumes de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, EDTA 4 mM, KCl 150 mM). Le broyat est centrifugé à 17 700g à 4°C afin de récupérer les protéines quasiment pures en solution dans le surnageant. Elles sont dénaturées à 100°C pendant 5 min, avant le dépôt sur un gel SDS-PAGE.

#### 3.2. Dosage des protéines

Le dosage protéique est réalisé selon le protocole décrit par Bradford (1976). Une gamme étalon de BSA allant de 0 à 25 µg/ml de protéines est réalisée dans de l'eau, dans un volume final de 1 ml. Les essais sont également dilués dans l'eau. Le réactif de Bradford est ajouté (1 ml) à chaque essai, avant agitation et lecture de l'absorbance à 595 nm. La concentration protéique de chaque échantillon est estimée par référence à la droite étalon obtenue avec la gamme de BSA, après élimination de la valeur de l'absorbance du témoin blanc ne contenant que de l'eau et du réactif de Bradford.

#### 3.3. Analyse des protéines en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE) assure une séparation des protéines essentiellement en fonction de leur taille. En effet, le SDS charge négativement les protéines proportionnellement à leur masse et favorise leur déplacement vers l'anode. Notre protéine d'intérêt étant de haut poids moléculaire, nous avons utilisé un gel de séparation à 12% composé de : 6,5 ml d'eau, 4,5 ml d'acrylamide à 40%, 3,8 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 75 µl de SDS 20%, 150 µl d'APS 10% et 6 µl de TEMED. Après polymérisation du gel de séparation, un gel de concentration (5%) composé de 3,7 ml d'eau, 625 µl d'acrylamide 40%, 630 µl de Tris-HCl 1M pH 6,8, 25 µl de SDS 20%, 50 µl d'APS 10% et 5 µl de TEMED est coulé. La migration s'effectue dans un tampon (Tris base 124 mM, glycine 96 mM, SDS 0,5%) sous l'effet d'un courant constant de 20 mA.

#### 3.4. Immunodétection des protéines par transfert actif sur membrane de nitrocellulose

Cette technique dite de « Western Blotting » utilise des anticorps spécifiques pour la reconnaissance de protéines séparées en SDS-PAGE. Après l'électrophorèse, le gel est placé au

contact d'une membrane de nitrocellulose de 0,22  $\mu\text{m}$  (optitran) préhumidifiée avec du tampon de transfert (glycine 39 mM, méthanol 20%, Tris-HCl 48 mM pH 8,3, SDS 0,037%, pH ajusté à 9,2). Le transfert est réalisé sous un courant d'intensité de 200 mA pendant 35 min. Après saturation des sites de fixation non spécifiques pendant 1 h à 20°C et sous agitation dans du TBS (Tris Base 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) avec du lait 5%, la membrane de nitrocellulose est incubée 1 h à 20°C, sous agitation dans une solution contenant l'anticorps primaire dilué au 1/2000<sup>ème</sup> dans du TBS-lait à 2,5%. La membrane est ensuite lavée plusieurs fois au TBS-Tween 0,1%, puis mise en contact avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase, dilué au 1/1000<sup>ème</sup> (dans du TBS-lait 2,5%) pendant 1 h, à 20°C et sous agitation. Après une série de quatre lavages de 15 min dans du TBS-Tween, la membrane est mise au contact du réactif de chemiluminescence (Roche) pendant 1 min à l'obscurité. Ce réactif contient du luminol et du peroxyde d'hydrogène. Sous l'effet de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire, le luminol est oxydé en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le produit ainsi formé émet de la lumière au niveau de la bande protéique d'intérêt. Ce "spot" impressionne, après un temps d'exposition variable, un film autoradiographique.

### 3.5. Tests d'activité

La réaction de phosphorylation de l'AMPK par LKB1 (Upstate) se produit dans un tampon contenant 50mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT et 100 mM ATP. Le test d'activité de l'AMPK consiste en la fixation d'un phosphate sur un peptide de synthèse SAMS (HMRSAMSGHLHLVKRR). Les protéines sont d'abord extraites puis placées en conditions de réaction. 200 mg de tissus sont broyés dans 9 volumes de tampon d'homogénéisation (Mannitol 200 mM, NaF 50 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Le mélange est centrifugé 30 minutes à 4°C à 37000 rpm. 144 mg de sulfate d'ammonium sont ensuite ajoutés par ml de surnageant récupéré. Le mélange est agité pendant 30 minutes puis centrifugé à nouveau à 37 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le culot est ressuspendu dans 100  $\mu\text{l}$  de tampon d'homogénéisation. L'échantillon est dilué au 1/5<sup>ème</sup>. La réaction de phosphorylation du peptide de synthèse se produit dans un milieu contenant 40 mM HEPES, 0.2 mM AMP, 80 mM NaCl, 8% glycerol, 0.8 mM DTT, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM ATP, 0.2 mM SAMS auquel est ajouté 0,02  $\mu\text{l}$  de P<sup>32</sup>- $\gamma$ ATP 10 mCi/ml par essai. Le mélange est incubé 10 minutes à 37°C, puis déposé sur papier Whatmann P81. Le papier Whatmann est lavé 6 fois 5 minutes dans 150 ml d'acide phosphorique 1%, suivi d'un lavage final dans 50 ml d'acétone. Les papiers Whatmann sont ensuite placés dans des fioles à scintillation, et comptés au compteur à scintillation.

### 3.6. Immunoprécipitation

Des billes d'agarose couplées à un anticorps anti-Ig G de lapin (Rockland) sont incubées la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-PRKAG3. Les billes sont ensuite lavées avec un tampon composé de Tris 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 1%, BSA 1%, PMSF 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 1 mM et MgCl<sub>2</sub> 5 mM, puis incubées, sous agitation rotative à 4°C, avec 1 mg de protéines totales. Le mélange est centrifugé et les billes et le surnageant sont repris séparément dans 80 µl d'Hepès 30 mM pH 7,4 avec 300 µM d'adénosine.

## 4. Méthodes relatives aux cellules

### 4.1. Transfections transitoires

La culture cellulaire est réalisée dans les conditions standards dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules COS7 sont mises en culture dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complété avec 20 % de sérum de veau foetal (SVF), 2 mM de L-glutamine, 1 X d'acides aminés non essentiels, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine (Eurobio). Les cellules HEK293 quant à elles, sont cultivées dans un milieu DMEM (Sigma D5796) supplémenté avec 10 % de SVF, 4,5 mg de glucose, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine. Les cellules COS7 et HEK293 sontensemencées sur des boîtes de 100 mm de diamètre à une densité de 9 x 10<sup>5</sup> et 3 x 10<sup>6</sup>, respectivement, 18 h avant d'être transfectées avec 10 µg d'ADN. 25 µl d'agent de transfection, « Polyfect Transfectin Reagent » (Qiagen), ont été utilisés pour les COS7. La quantité d'agent transfectant et d'ADN ainsi que la densité des cellules avant transfection ont été déterminées par des expériences d'optimisation de la transfection. Les cellules HEK sont transfectées avec 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM et de l'HeBS 2X. Les cellules sont récoltées 48 heures après la transfection dans 3 ml de tampon PBS et lysées avec un tampon contenant 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 20% glycérol et 10 mM sodium cacodylate pH 6 pour les cellules COS7 ; et un tampon RIPA (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM NP40 1%, sodium deoxycholate 0,5%, SDS 0,1%) pour les cellules HEK293.

### 4.2. Expression bactérienne

Après une pré-culture de bactérie *E. coli* BL21, contenant le plasmide d'intérêt, réalisée sur la nuit à 37°C sous agitation, 50 ml de milieu LB estensemencé avec une dilution 1/100 à partir de la pré-culture. La croissance bactérienne a lieu à 37°C sous agitation à 250 rpm jusqu'à une D.O.<sub>600</sub> de 0.48-0.5, suite à quoi il y a induction par ajout de 0.05 mM IPTG. Le milieu de culture est agité, à 37°C, à 250 rpm pour une induction de deux heures. Une fois l'induction terminée, les cellules sont récoltées par centrifugation et conservées à -80°C comme décrit précédemment. Les protéines sont extraites à l'aide d'un tampon de lyse (0.1 M Tris-HCl pH8.0, 2 mM EDTA, 5% glycérol, 0.5 mM DTT). La lyse est effectuée sur glace à l'aide d'un sonicateur, obtenue suite à une série de trois traitements de 30 secondes entrecoupés de repos sur glace.

### 4.3. Production in-vitro

Dans le système RTS, la transcription est effectuée par l'ARN polymérase du phage T7 et la traduction par un lysat bactérien de type S30 amélioré. Les principales propriétés de ce système sont

une automatisation complète du gène à la protéine en quelques heures, ainsi qu'aucun recours à l'utilisation d'une cellule vivante permettant de produire des protéines toxiques.

Le gène d'intérêt est cloné dans le vecteur pIVEX 2.4 (Roche). La réaction est réalisée à l'aide du kit « RTS 500 *E. coli* HY » (Roche) en utilisant 10 µg de plasmide. La réaction se déroule dans l'appareil RTS 500 Instrument (Roche) à 30°C, sous une agitation de 150 rpm pendant 24 heures.



# *Résultats*





Cette nouvelle partie concerne les résultats obtenus au cours du projet de thèse. Elle est scindée en quatre parties. Les trois premières parties constituent directement le projet de thèse sur le gène *PRKAG3* bovin avec une étude détaillée du gène *PRKAG3* dans le but de comprendre son expression avec un volet plutôt finalisé dans le sens où les marqueurs génétiques identifiés sur le gène *PRKAG3* sont utilisés pour la recherche d'une corrélation avec un caractère physique de la viande et la régulation de ce gène. La deuxième partie traite de l'étude fonctionnelle de la protéine codée par le gène *PRKAG3*. La troisième partie révèle un volet fondamental du travail sur l'étude moléculaire des différents gènes de l'AMPK bovine. Enfin, le dernier chapitre présente les résultats d'un projet parallèle sur le gène *PPARG*.



## 1. Le gène *PRKAG3* bovin

### Résultats

#### 1.1. Structure du gène *PRKAG3* bovin et recherche de polymorphismes

Lorsque j'ai débuté l'étude sur l'AMPK bovine, le gène *PRKAG3* bovin n'était pas identifié. Le séquençage du gène à partir d'un individu de race Charolaise avait déjà été entrepris avant mon arrivée. Les ARNs et l'ADN ont été extraits à partir de 400 à 500 mg de tissus pour les ARNs et 100 à 200 mg pour l'ADN de muscles de quatre individus (deux Charolais, un Limousin et un Angus). Nous obtenons en moyenne 1 à 1,5 µg d'ARN et 4 à 5 µg d'ADN par mg de tissus.

Le gène bovin était en partie séquencé avec sa région promotrice. J'ai terminé le séquençage du gène de cet individu et séquencé entièrement trois nouveaux individus de race bovine différente (un Charolais, un Limousin et un Angus). Grâce à la séquence des ADNc obtenues par RT-PCR à partir des ARNs, et à celle de l'ADN, j'ai pu reconstituer la structure détaillée du gène *PRKAG3* bovin (Figure 15). Il est composé de 13 exons et de 12 introns dans sa région codante. La séquence de l'ARNm est connue à partir du +1 de traduction jusqu'au codon Stop avec une partie du 3' UTR. La protéine prédite possède 490 acides aminés. La séquence codante du gène *PRKAG3* bovin et la protéine résultante partagent respectivement 83% et 86% d'homologie avec la séquence humaine.

La séquence codante du gène a été entièrement déterminée pour les 4 individus à partir desquels les ARNs totaux ont été extraits. Des polymorphismes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ont été identifiés dans les exons soit par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), soit par l'observation sur les chromatogrammes de séquences de pics doubles, caractéristiques d'individus hétérozygotes pour un SNP. Les polymorphismes au niveau des introns, ont été mis en évidence par le séquençage des ADN génomiques. Cette recherche de polymorphisme a été complétée par une étude réalisée dans le cadre d'un projet plus large, le projet européen GeMQual, visant à identifier des déterminants génétiques de la qualité de la viande bovine, au travers d'un criblage de gènes candidats afin d'isoler un grand nombre de polymorphismes et de faire une étude d'association entre polymorphismes et caractères métaboliques d'animaux de différentes races. Cette recherche de polymorphisme, réalisée dans un premier temps par la technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) repose sur une comparaison de profil d'électrophorèse entre 11 individus de 11 races différentes. 32 individus de 16 races différentes ont été utilisés en tout.

Un grand nombre de polymorphismes de type SNP ont été identifiés aussi bien dans les régions codantes que non codantes du gène. Un total de 46 polymorphismes a été mis en évidence

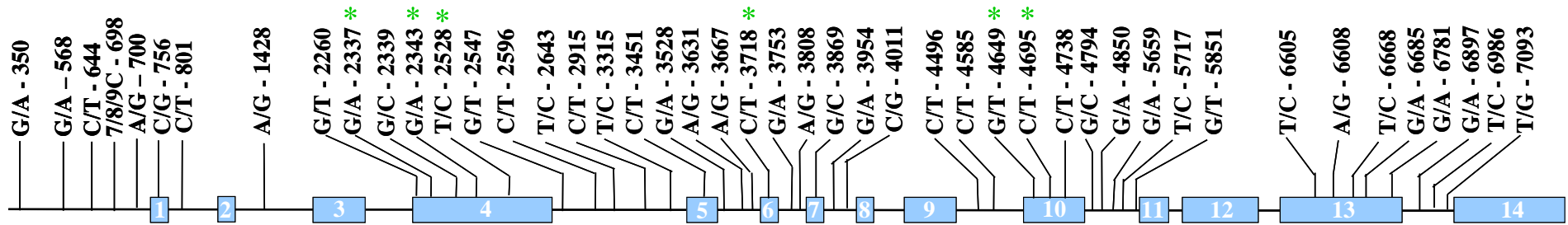


Figure 15 : Structure du gène *PRKAG3*.

Le gène *PRKAG3* (7688 pb) est composé de 12 introns et de 13 exons dans sa région codante. Les SNPs trouvés ont été répertoriés sur la structure intron–exon du gène. Les polymorphismes exoniques provoquant un changement en acide aminé au niveau de la protéine sont localisés par une \*. Les positions des SNPs sont indiquées à partir du début de la séquence promotrice connue (744 pb en amont de l'ATG). (Numéro d'accèsion Genbank NM\_001030302).

(Figure 15), ce qui est relativement important pour une si courte région (soit 1 SNP tous les 147 pb). Ce nombre important de SNP sera discuté dans la partie Discussion. Deux des quatre polymorphismes identifiés par Mc Kay et Womack (2002) ont également été retrouvés dans l'exon 4, dont un provoque un changement d'acide aminé.

La plupart des polymorphismes identifiés n'affectent pas la séquence protéique. Seulement six d'entre eux provoquent un changement en acide aminé, et ils sont retrouvés à des fréquences très faibles. Les changements en acide aminé dus à des SNPs ont été localisés sur la séquence protéique de la sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK (Tableau 2). Un SNP dans l'exon 4 (position 2260) change une Alanine en une Sérine (A121S) dans la région N-terminale de la protéine, de même que le SNP en position 2339 (changement d'un résidu Tryptophane en Sérine). Le polymorphisme dans l'exon 6 (position 3718) provoque le changement d'une Arginine en Tryptophane (R256W) entre deux domaines CBS (CBS 1 et CBS 2). De la même manière, un autre SNP, dans l'exon 10 (position 4649) provoque le changement d'un Acide Glutamique en Tyrosine (D351Y) entre deux domaines CBS (CBS 2 et CBS 3). Ce polymorphisme se trouve être caractéristique de la race Charolaise. Enfin, un deuxième SNP dans l'exon 10 (position 4695), qui n'est présent que chez des animaux de race Limousine, substitue une Méthionine à une Thréonine (T366M) dans le domaine CBS 3. Un sixième polymorphisme a été identifié dans l'exon 4 (position 2528) lors du séquençage d'animaux de race Chianina. Celui-ci entraîne le changement d'une Méthionine par une Thréonine (M210T). Ce polymorphisme n'a, en outre, pas été retrouvé dans les autres races étudiées.

**Tableau 2:** Positions et fréquences alléliques, dans quatre races bovines, des polymorphismes entraînant un changement sur la séquence protéique de la sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK bovine. 40 individus Charolais, 40 individus Limousin, 100 individus Holstein et 60 individus Chianina, tous non-apparentés, ont été génotypés pour déterminer les fréquences alléliques.

SNP	Exon / position	Changement en acides aminés	Fréquences alléliques			
			Charolais	Limousin	Holstein	Chianina
2260 G/T	E4/129	A121S	0.72 - 0.28	0.80 - 0.20	0.88 - 0.12	0,47 - 0.53
2339 G/C	E4/208	W147S	0.98 - 0.02	0.96 - 0.04	1 - 0	0,99 - 0.01
2528 T/C	E4/397	M210T	1 - 0	1 - 0	1 - 0	0.94 - 0.06
3718 C/T	E6/48	R256W	0.98 - 0.02	0.94 - 0.06	0.96 - 0.04	0,99 - 0.01
4649 G/T	E10/46	D351Y	0.83 - 0.17	1 - 0	1 - 0	1 - 0
4695 C/T	E10 / 92	T366M	1 - 0	0.97 - 0.03	1 - 0	1 - 0

Le génotypage de polymorphismes existants sur différentes races d'origine Italienne (Chianina, Romagnola, Marchigiana, Piemontese, Podolica et Maremmana) a permis d'identifier 3 polymorphismes non observés dans les races Françaises, deux d'entre eux sont situés dans l'exon 4 (positions 2337 et 2528), le troisième étant dans l'intron 4 (position 2596).

### 1.2. Analyse des transcrits du gène *PRKAG3* bovin

En plus de ces variations génétiques, nous avons mis en évidence la présence de sites d'épissage alternatif. Ce phénomène d'épissage alternatif se produit au niveau des extrémités 5' des exons 2 et 10 et provoque l'insertion, dans les transcrits, de 18 nucléotides de la fin de l'intron 1 et de 3 nucléotides de la fin de l'intron 9 et donc de 6 et 1 acides aminés respectivement dans la protéine. Le site consensuel d'épissage de fin d'intron (AG) est conservé. Le clonage et le séquençage des transcrits d'individus différents ont montré que les deux épissages possibles à chacun des deux sites concernés se produisaient dans tous les cas, de façon indépendante et sur les deux allèles, donnant ainsi une population hétérogène de transcrits. Ce phénomène d'épissage n'a jamais été décrit chez l'homme pour ce gène. De plus, le niveau d'expression relatif d'épissage des transcrits longs et courts (avec ou sans les 18 derniers nucléotides de la fin de l'intron 1, respectivement) a été mesuré par RT-PCR semi-quantitative dans le muscle squelettique de différents individus. Dans tous les cas, le transcrit court (sans insertion) présente un niveau d'expression significativement supérieur au transcrit long. La même méthode a été utilisée afin de mesurer le taux d'expression relatif des transcrits au niveau de l'épissage alternatif de la fin de l'intron 9. Cependant nous n'avons pu obtenir un signal spécifique de chaque transcrit. L'insertion de 3 nucléotides seulement ne permet pas une synthèse de sonde spécifique de chaque allèle pour réaliser une quantification précise des différents transcrits. Nous pouvons cependant supposer, d'après des expériences de clonage des ADNc du gène *PRKAG3*, que la forme longue se trouve également sous exprimée par rapport à la forme courte. En effet, lors de la vérification des clones, la fréquence des clones sans insertion était plus importante que celle avec insertion.

Ces différents résultats sur la structure et l'identification de variations génétiques comme les polymorphismes ou les épissages alternatifs sont présentés dans le premier article : Characterization of the bovine *PRKAG3* gene: structure, polymorphism, and alternative transcripts. (Mammalian Genome. 2006 ; 17(1):83-92.) Dans cet article, seuls 32 polymorphismes de type SNP sont décrits.

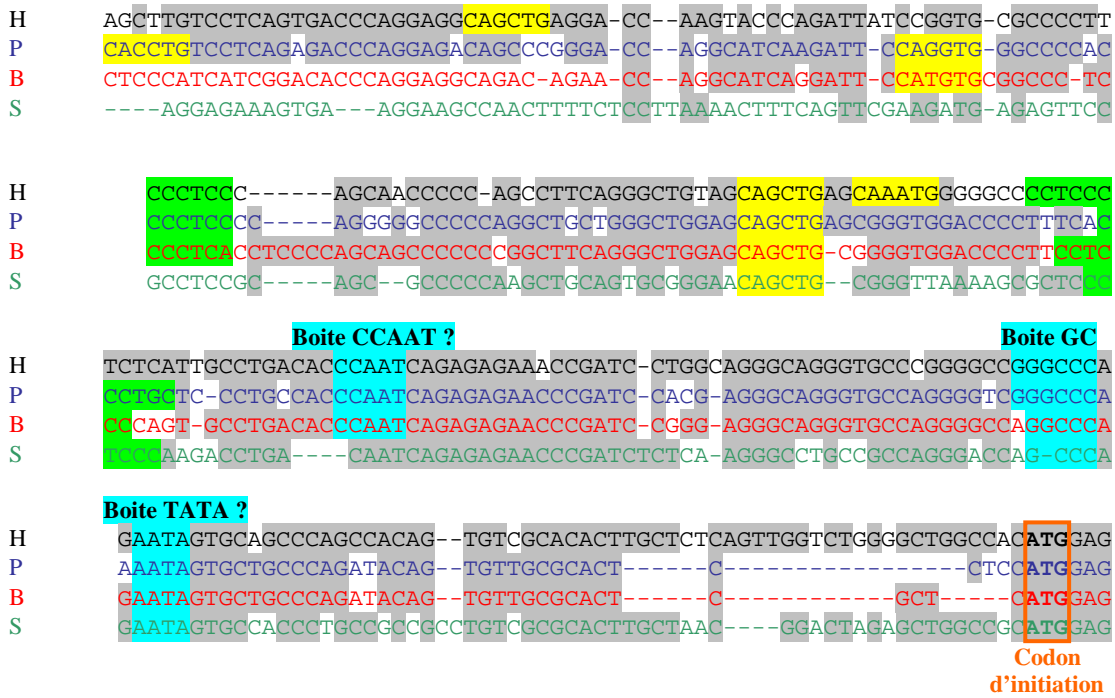
### 1.3. Etude de la région promotrice du gène *PRKAG3*.

Aucune information de séquence n'était disponible sur la région promotrice du gène *PRKAG3* et la région 5'. Grâce à des clones de BAC contenant le gène *PRKAG3*, un fragment en amont du site initiateur de traduction a été identifié. Cette région, considérée comme une région promotrice potentielle, est comparée avec les régions homologues du gène *PRKAG3* humain, porcine et murine (Figure 16). Elle nous a permis d'apprécier la présence éventuelle et la conservation de sites consensus caractéristiques. On remarque l'existence d'une boîte TATA, une boîte CCAAT et une boîte GC, qui sont des éléments classiques des promoteurs eucaryotes. On note la présence de sites potentiels de fixation pour le facteur ubiquitaire trans-activateur SP1. De plus, il existe plusieurs consensus de type boîte-E, connus comme étant des sites de liaison à l'ADN pour les protéines spécifiques des gènes exprimés dans le muscle (gènes bHLH et les gènes de la famille MyoD) (van Maanen *et al.*, 1999). Ces prédictions relèvent d'une analyse bio-informatique, elles devraient être confirmées par une étude fonctionnelle.

Nous avons mis en évidence plusieurs polymorphismes dans la région promotrice, dont un de type insertion/délétion. Nous avons la présence d'une région présentant de 7 à 9 C suivant les allèles, dans la séquence promotrice.

### 1.4. Analyse quantitative du taux de transcrits *PRKAG3*

Afin d'établir si ces polymorphismes observés sont associés avec le niveau d'expression du gène, une étude quantitative a été réalisée sur des individus présentant des variations au niveau génétique. Cette quantification ne distingue pas les différents transcrits alternatifs. Des individus présentant différents allèles ont donc été choisis et les taux de transcrits du gène *PRKAG3* ont été quantifiés chez plusieurs animaux de races Charolais et Limousin. Chaque échantillon est analysé en triplicat. Cette étude quantitative montre un niveau variable d'expression des transcrits en fonction du génotype. Cependant, tous les individus hétérozygotes au niveau du nucléotide situé en position 2339 ont tous un taux de transcrits 2 à 5 fois plus important que des animaux homozygotes pour l'allèle G à cette position (Figure 17). Cependant, comme l'allèle C se retrouve à une très faible fréquence dans la population bovine analysée, il nous a été impossible de trouver un individu homozygote pour cet allèle afin de vérifier s'il est associé à une encore plus forte proportion de transcrits. Aucun autre des polymorphismes présent sur le gène n'a pu être associé avec cette augmentation du taux de transcrits.



Légendes :

H : Homme    B : Bovin    Boite E    . : zone de similitude  
P : Porc      S : Souris    Site de fixation SP1

Figure 16 : Représentation hypothétique du promoteur *PRKAG3*.



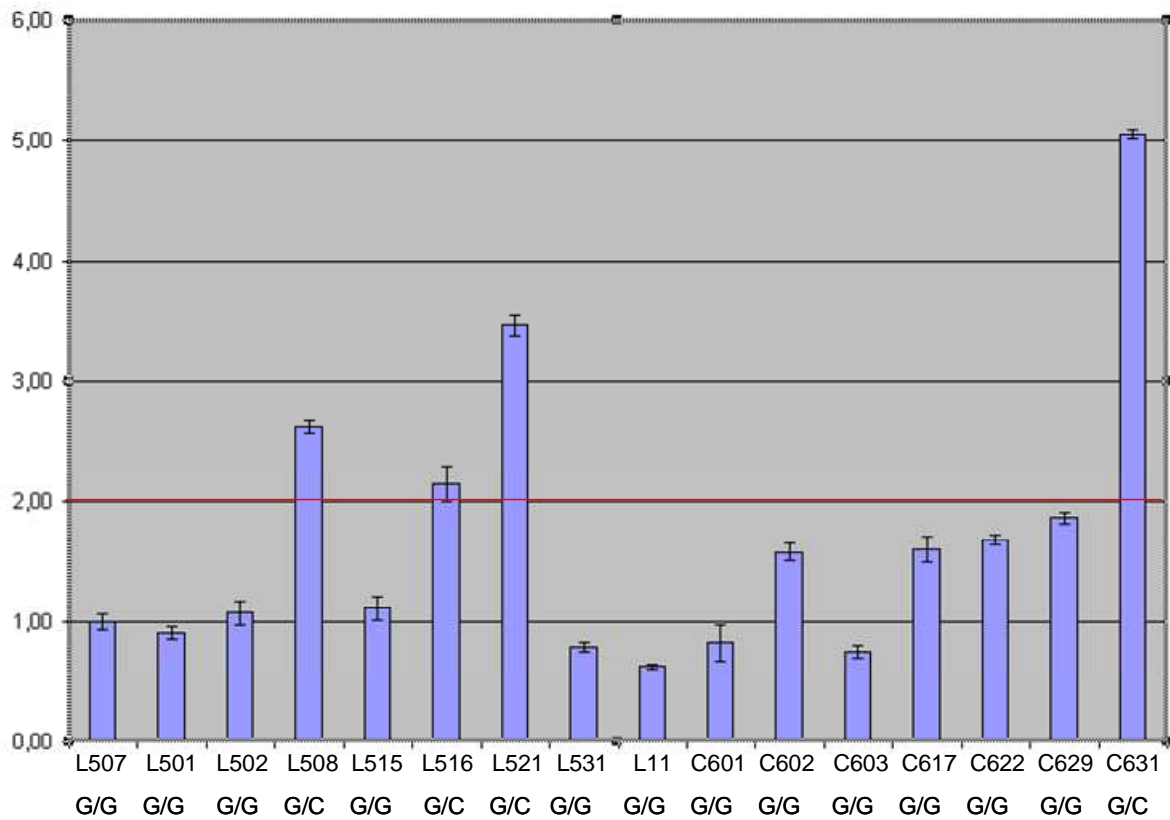


Figure 17 : Résultats de quantification des transcrits *PRKAG3* totaux réalisés sur 9 animaux Limousin et 7 Charolais.

Le génotype situé en dessous de chaque individu correspond au génotype du polymorphisme situé en position 2339 du gène.

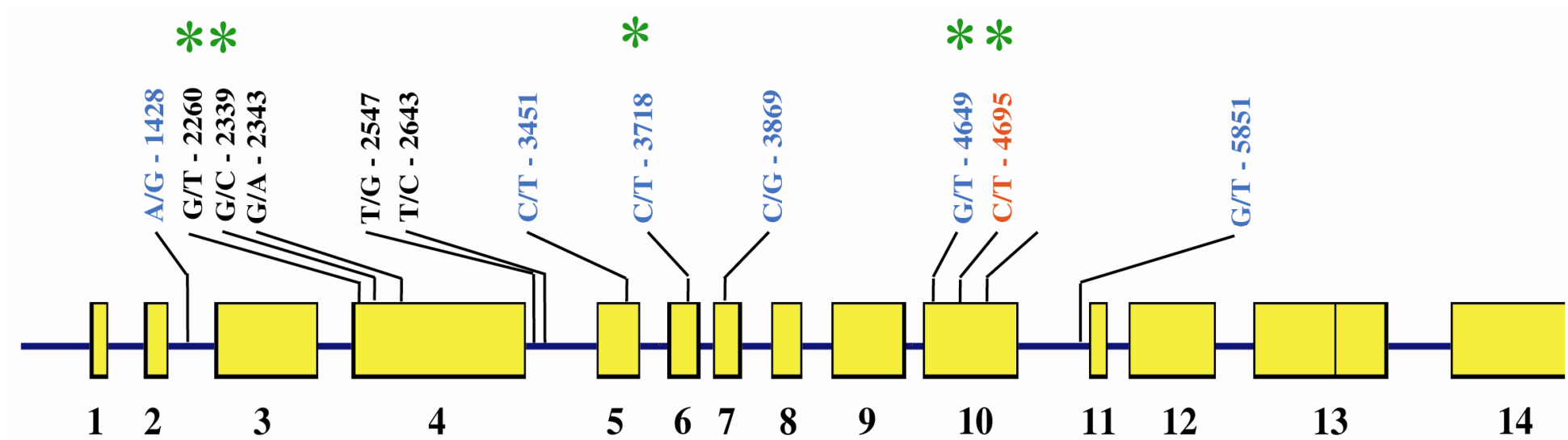


Figure 18 : Position des 12 SNPs génotypés sur les veaux Holstein.

\* représente les polymorphismes provoquant un changement en acide aminé, en noir sont indiqués les SNPs génotypés par séquençage, en bleu ceux par TaqMan et en rouge celui par Amplifluor.

### 1.5. Génotypage des polymorphismes et étude d'association

Le gène *PRKAG3* bovin est très riche en polymorphismes de type SNP, il présente donc une grande variabilité génétique. De plus, nous avons montré que l'une des mutations est associée à une augmentation du taux de transcrits du gène. Nous avons entamé une étude préliminaire afin de voir s'il existe chez le bovin une relation entre le gène *PRKAG3* et certaines propriétés organoleptiques de la viande.

Cette étude porte sur 100 veaux de race Holstein, provenant de différents élevages et abattus en 3 séries à l'âge d'environ 4 mois. L'étude est réalisée en collaboration avec l'équipe QuaPA de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix, l'organisme de sélection MIDATEST et la société Spanghero (Castelnaudary). Afin de réaliser différentes mesures phénotypiques et les génotypages de ces individus, plusieurs morceaux du muscle *Longissimus thoracis* ont été prélevés à l'abattage ainsi que 24 heures après l'abattage. La plupart de ces veaux sont non apparentés, certains sont des demi-frères issus du même père (23 veaux pour 9 pères).

Pour ce qui concerne les caractères phénotypiques que nous nous proposons d'étudier, nous nous sommes inspirés des effets de la mutation RN<sup>-</sup> chez le porc. La mutation RN<sup>-</sup> est associée à un taux élevé de glycogène. De plus, les animaux porteurs de cette mutation produisent des pertes en eau plus importantes lors de l'élaboration des jambons. Pour ces 100 animaux, nous disposons de données sur leur état civil (numéro national, date de naissance et d'abattage, et pour certains sur le poids à la naissance et le numéro d'identification du père et de la mère), sur le poids de carcasse à l'abattage (Poids CC) et à 24 heures (Poids CF), ainsi que sur la mesure de pH à l'abattage (pH1) et à 24 heures (pH24), avec la différence de pH (Chute pH). Des caractères concernant la perte en eau ont été mesurés, comme la mesure d'exsudation entre les jours 2 et 7 après abattage (Perte steak) avec la teneur de perte en eau (PRE), ainsi que la mesure d'exsudation sous vide entre 24 et 48 heures après l'abattage (Perte LD). D'autres mesures de type biochimiques, le dosage du glycogène et du lactate, ont également été effectuées.

En ce qui concerne le génotypage, sur les 46 polymorphismes de type SNP du gène *PRKAG3*, nous avons génotypé seulement 12 d'entre eux (Figure 18) parmi lesquels se retrouvent les 5 polymorphismes provoquant un changement en acide aminé, les autres étant répartis tout au long du gène. 5 polymorphismes ont été génotypés par séquençage, 6 par TaqMan<sup>®</sup> et un par Amplifluor.

Les résultats des génotypages sont présentés en annexe 2. Dans la suite de cette étude, nous ne parlerons plus des SNPs en position 2339, 4649 et 4695 car aucune variabilité n'est présente dans ce groupe d'animaux.

A l'aide du logiciel PHASE v2.1.1, les haplotypes de chaque individu ont été reconstruits. Au final, 11 haplotypes différents ont été identifiés, dont 3 (B, H et K) sont majoritaires (Tableau 3).

Tableau 3 : Récapitulatif des différents haplotypes et de leurs fréquences.

	<i>Haplotype</i>	<i>Fréquence de l'haplotype</i>
<i>A</i>	<i>AGGGGCCCCGGCG</i>	<i>1%</i>
<i>B</i>	<i>AGGGGTCCCGCG</i>	<i>66%</i>
<i>C</i>	<i>AGGGGTCCCGCG</i>	<i>1%</i>
<i>D</i>	<i>AGGGGTCTGGCG</i>	<i>4%</i>
<i>E</i>	<i>AGGGGTTCGGCG</i>	<i>0.5 %</i>
<i>F</i>	<i>AGGAGCCCCGGCG</i>	<i>1%</i>
<i>G</i>	<i>GGGGGCCCCGGCG</i>	<i>2%</i>
<i>H</i>	<i>GGGAGCTCCGCT</i>	<i>12%</i>
<i>I</i>	<i>GGGAGTTCGGCG</i>	<i>0.5 %</i>
<i>J</i>	<i>GTGGGCCCCGGCG</i>	<i>0.5 %</i>
<i>K</i>	<i>GTGGTCCCGGCG</i>	<i>11.5 %</i>

Nous avons commencé par regarder si la distribution des allèles suivait la distribution de Hardy-Weinberg. L'équilibre de Hardy-Weinberg est le modèle théorique central de la génétique des populations. La loi de Hardy-Weinberg permet, le calcul des fréquences alléliques à partir des fréquences génotypiques. La notion d'équilibre dans le modèle de Hardy-Weinberg est soumise aux hypothèses/conditions suivantes :

- la population est panmictique (les couples se forment au hasard (panmixie), et leurs gamètes se rencontrent au hasard (pangamie))
- la population est "infinie" (très grande: pour minimiser les variations d'échantillonnage)
- il ne doit y avoir ni sélection, ni mutation, ni migration (pas de perte/gain d'allèle)
- les générations successives sont discrètes (pas de croisement entre générations différentes).

Si les fréquences des allèles d'un SNP sont  $p$  et  $q$ , les fréquences théoriques des génotypes sont  $p^2$ ,  $2pq$  et  $q^2$ . Nous avons comparé, à l'aide d'un test du  $\chi^2$  à 2 degrés de liberté, les fréquences génotypiques théoriques et observées pour chacun des SNPs. En aucun cas, la conformité entre les fréquences n'a été rejetée. Nous pouvons donc dire que la population de notre échantillon a été obtenue par une reproduction au hasard et que l'équilibre de Hardy-Weinberg a été respecté.

Les mesures qui nous semblaient au départ les plus intéressantes étaient les quantités de glycogène intra-musculaire ainsi que les capacités de rétention d'eau du muscle. Au vu du nombre important de paramètres physiques mesurés, une corrélation entre les différentes variables quantitatives a été recherchée. Est-ce que d'autres caractères sont associés à la quantité de glycogène ou à la teneur de perte en eau ? La corrélation entre les variables peut être définie par le coefficient de corrélation de Pearson, à condition que leur distribution suive la loi normale. Nous avons vérifié que c'était effectivement le cas, sauf pour la concentration en lactate. Ce problème a été résolu en transformant les valeurs du taux de lactate par la fonction racine carrée. Le coefficient de corrélation de Pearson est toujours compris entre 1 et -1. Un coefficient de 1 indique que les deux séries varient de manière strictement proportionnelle, une valeur de 0 indique que les deux séries sont complètement indépendantes et un coefficient de -1 indique que les deux séries réagissent inversement. Cette mesure de corrélation entre les différentes variables a été réalisée à l'aide du logiciel Systat vers. 7.0. La significativité de cette corrélation a été évaluée grâce au test de Bonferroni. Nous avons ensuite décidé de ne retenir que les résultats significatifs au seuil de 5% ou 1% (Tableau 4).

Tableau 4 : Corrélations de Pearson entre les variables phénotypiques.

Abréviations : valeurs soulignées :  $p < 0.05$  ; valeurs en gras :  $p < 0.01$  ; Poids CC : poids de carcasse à l'abattage ; Poids CF : poids de carcasse à 24 heures ; pH1 : pH à l'abattage ; pH24 : pH à 24 heures ; Chute pH : différence de pH ; Perte steak : mesure d'exsudation entre les jours 2 et 7 après abattage ; PRE : teneur de perte en eau ; Perte LD : mesure d'exsudation sous vide entre 24 et 48 heures après l'abattage ; dosage du glycogène et du lactate.

	Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
Poids CC	1.0000	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Poids CF	<b>0.9962</b>	1.0000	----	----	----	----	----	----	----	----
pH1	-0.2083	-0.2604	1.0000	----	----	----	----	----	----	----
pH24	<u>-0.3260</u>	<b>-0.3807</b>	<b>0.6096</b>	1.0000	----	----	----	----	----	----
Chute pH	0.1623	0.1712	<u>0.3497</u>	<b>-0.5294</b>	1.0000	----	----	----	----	----
Glycogène	-0.0257	0.0193	<u>-0.3157</u>	<b>-0.3854</b>	0.1177	1.0000	----	----	----	----
Lactate	0.2411	0.2656	<b>-0.3836</b>	-0.2870	-0.0713	0.065	1.0000	----	----	----
Perte Steak	<u>-0.3441</u>	-0.3113	-0.1594	-0.1266	-0.0210	0.1879	0.0034	1.0000	----	----
PRE	-0.1915	-0.2141	0.2241	0.1352	0.0801	-0.1524	-0.0861	0.1286	1.0000	----
Perte LD	0.0268	0.0264	-0.1053	-0.0514	-0.0519	0.0276	0.0768	0.1335	0.0766	1.0000

Ceci, nous permet d'établir 3 groupes de variables. Le premier groupe comprend le poids de la carcasse à chaud, le poids de la carcasse à froid, la perte en eau sur les steaks et le pH à 24 heures. Le deuxième groupe comprend le taux de glycogène, le pH à 24 heures et marginalement le

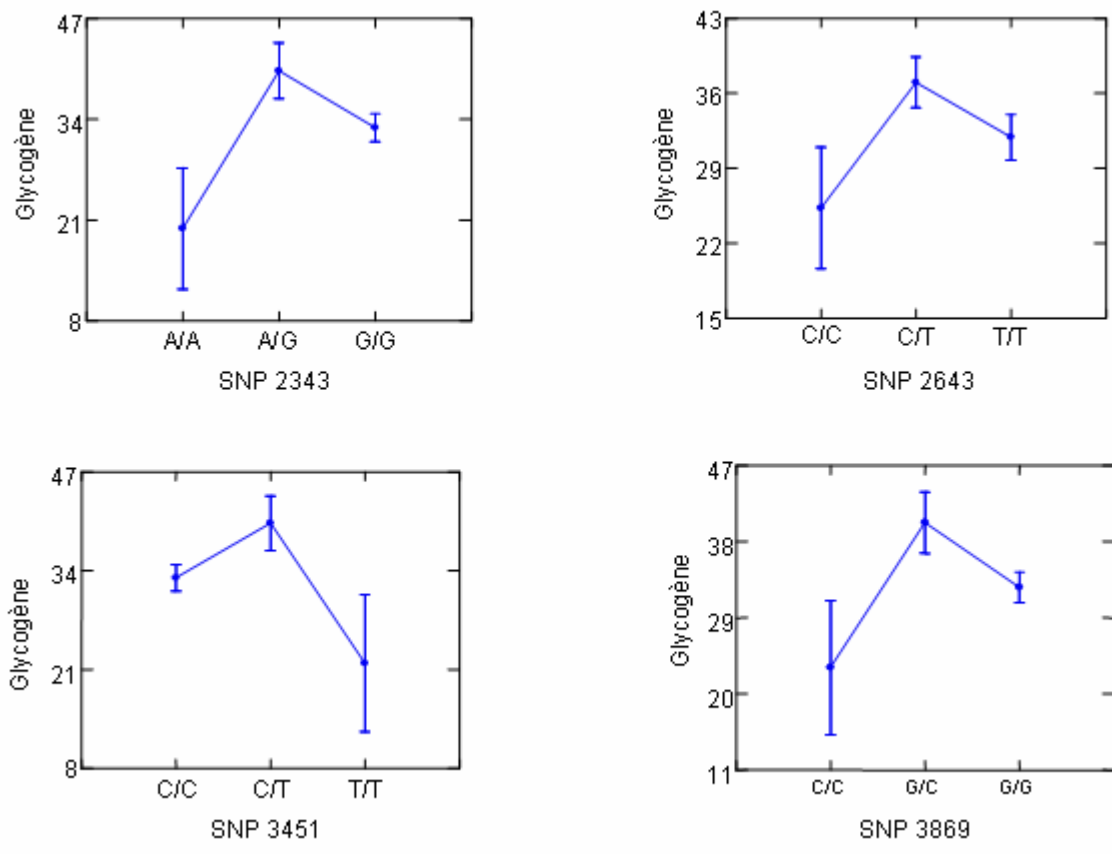


Figure 19 : Analyse de variance entre les valeurs de glycogène et les polymorphismes en position 2343, 2643, 3451 et 3869 sur le gène *PRKAG3*.

pH à l'abattage ; le troisième groupe comprend quant à lui, le pH à l'abattage, le pH à 24 heures et le taux de lactate. Toutes les autres variables présentes sont considérées comme des caractères indépendants. Le taux de glycogène et la perte en eau appartiennent à des groupes de variables indépendantes. Il est donc nécessaire de réaliser une analyse séparée pour chacune de ces variables.

Pour chacune des variables, on calcule la moyenne ainsi que l'écart type afin de mesurer l'étendue de la dispersion autour de la moyenne. On observe pour le glycogène et pour le lactate une grande variabilité dans la population (Tableau 5).

Tableau 5 : Calcul de moyennes et des écarts type pour chaque variable sur la totalité des individus.

	Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
Moyenne	130,618	129,519	6,991	5,595	1,395	33,800	7,985	2,768	1,169	6,054
Ecart type	13,681	13,800	0,190	0,210	0,178	16,059	7,006	0,648	0,146	1,847

Cette analyse est faite également en comparant le génotype pour chaque position et les valeurs phénotypiques (Annexe 3).

L'analyse de la variance permet de comparer la variabilité entre les groupes par rapport à la variabilité intra groupe, c'est-à-dire par rapport à la moyenne de chaque groupe. Plus précisément, cela revient à calculer le F-ratio (Fr) défini par le rapport entre la variance inter et la variance intra groupes.

Nous avons tout d'abord réalisé une analyse de variance exploratoire pour tous les caractères phénotypiques en prenant en compte tout d'abord les différents haplotypes, puis chaque position des différents SNPs utilisés pour cette étude. Cette analyse n'a, seulement, révélée qu'une association significative entre le SNP en position 2343 et la valeur du taux de glycogène (significativité <5%). Pour les valeurs du taux de glycogène, on observe également une association avec les positions 2643, 3451 et 3869 avec une significativité <10% (Figure 19).

Les résultats de l'analyse de variance entre les différentes valeurs phénotypiques et les différents haplotypes ne sont pas exploitables car il y a un trop grand déséquilibre dans la distribution des haplotypes. Cette analyse suppose en effet que les effectifs et que la dispersion des différents groupes soient du même ordre. Or, en moyenne dans la population, nous avons 72% d'homozygotes d'un type, 4% d'homozygotes de l'autre type et 24% d'hétérozygotes. Notre modèle présentant un fort déséquilibre, la solution statistique pour prendre en compte ce déséquilibre est





une randomisation. Nous avons effectué une randomisation prenant en compte 1000 tirages au sort successifs. A chaque simulation (permutation aléatoire des lignes du tableau des explicatives), on calcule le F-ratio de l'analyse de variance (Tableau 6). Les 1000 Fr calculés sont classés par ordre croissant. Il suffit de situer le Fr des valeurs brutes, non mélangées, à la liste des 1000 Fr obtenus par randomisation. Le rang exact du Fr calculé à partir des données non mélangées, représente la probabilité de significativité. Cette randomisation a été effectuée grâce au programme SNPA.exe.

Tableau 6 : Résultats d'ANOVAs avec randomisation pour le taux de glycogène. Pour chaque position, la probabilité associée au F-ratio exact est calculée par randomisation. Seuls les polymorphismes dont la significativité est inférieure à 10 % sont indiqués.

Position du polymorphisme	Fr <sub>2,97</sub>	Probabilité
2343	3.28	0.03
2643	2.43	0.03
3451	2.57	0.08
3869	2.70	0.07

Par cette analyse, nous avons pu observer que l'association entre le SNP en position 2343 et la valeur du taux de glycogène était significative avec une probabilité associée de 3%, il en est de même avec le SNP en position 2643. Pour les SNPs 3451 et 3869, nous pouvons noter une significativité marginale à 10 %. Dans tous les cas, les individus hétérozygotes présentent un taux supérieur au deux types d'homozygotes (Figure 19). Bien qu'aucune relation n'ait été faite entre les différents haplotypes et le taux de glycogène, on remarque toutefois que les animaux homozygotes pour l'allèle A en position 2343 sont tous homozygotes pour l'haplotype F ou H et que les animaux hétérozygotes en position 2343 sont hétérozygotes pour l'haplotype H (sauf l'individu numéro 76). L'haplotype H n'est en outre retrouvé chez aucun autre individu.

Nous avons recherché l'existence d'une corrélation entre les génotypes des différents sites polymorphes chez les 100 animaux de race Holstein. On peut ici utiliser le coefficient de corrélation de Spearman qui va indiquer le degré de liaison de tous les sites par rapport au génotype. Une forte valeur du coefficient de corrélation de Spearman indiquera une liaison entre les deux variables. Le coefficient de corrélation de Spearman s'interprète de la même manière qu'un coefficient de corrélation de Pearson. Une valeur positive (maximum = +1) indique une variation simultanée dans le même sens, une valeur négative (minimum = -1) une variation simultanée en sens inverse. La

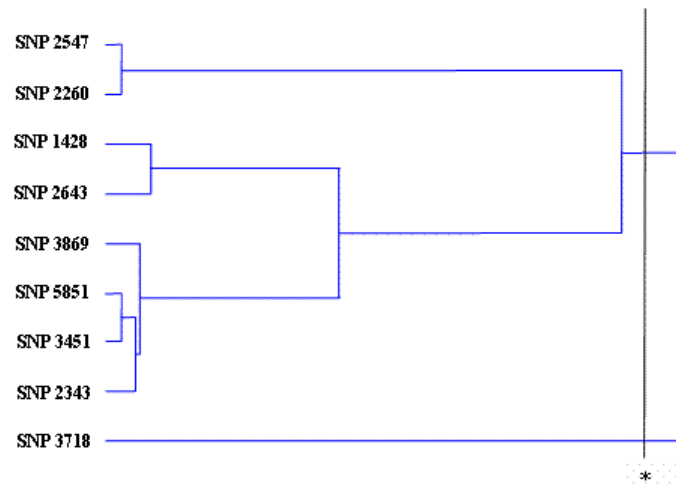


Figure 20 : Classification hiérarchique des SNPs du gène *PRKAG3* selon le coefficient de Spearman d'après le génotypage de la population Holstein. \* représente le seuil de significativité  $P=0.01$ .

différence entre les deux coefficients repose sur la nature des valeurs numériques. Le coefficient de Pearson est calculé à partir des données brutes des variables numériques, sur les rangs d'échelles ordinales.

La liaison entre les différents polymorphismes est significative ( $P=0.05$ ). Nous observons même une limite où tous les polymorphismes hormis celui en position 3718 sont liés avec une significativité de  $P=0.01$  (Figure 20). Ceci montre une apparition des SNPs à différents moments de l'évolution.

La classification hiérarchique des SNPs du gène *PRKAG3*, selon le coefficient de Spearman, permet de séparer les polymorphismes en fonction de leur date de survenue. Les SNPs 3869, 5851, 3451, 2343 sont associés dans le même groupe et présentent également une forte association dans les haplotypes. Les SNPs 1428 et 2643 sont survenus à une époque quasi-identique, et voisine du groupe précédent. Nous interprétons la faible association entre les 2 groupes précédents et le groupe 2547 et 2260, et a fortiori le 3718, par une date d'apparition bien plus éloignée. Nous pouvons ainsi regrouper les différents polymorphismes entre eux selon leur date d'apparition.

Les SNPs 1428 et 5851 ne présentent pas d'association significative avec le taux de glycogène. Les autres polymorphismes appartenant à ces deux groupes présentent eux une association significative inférieure à 10%, voir même inférieure à 5% pour deux d'entre eux. Ceci pourrait laisser à supposer qu'un polymorphisme situé entre les deux bornes externes et dont la date de survenue est située à la même époque pourrait expliquer la variation observée du taux de glycogène.

Le test de Mantel permet de déterminer s'il y a corrélation entre la distance génétique entre les marqueurs moléculaires d'un même groupe de liaison et la distance physique. La valeur d'un paramètre d'association est calculée à partir des données réelles, puis comparée à la série de valeurs obtenues par permutations aléatoires de l'ordre des populations dans l'une des deux matrices de distance. Grâce au logiciel PAST, nous avons pu montrer que la corrélation entre la distance génétique et la distance physique n'est pas significative au seuil  $P=0.05$ . Cette absence de liaison pourrait s'expliquer par le fait que les SNPs sont apparus à des temps différents donc ils ne sont pas tous liés entre eux.

Cette étude nous a permis de voir qu'il existe une relation potentielle entre le gène *PRKAG3* et la teneur en glycogène dans la viande bovine. Deux SNPs présents sur le gène se trouvent associés significativement avec la quantité de glycogène intra-musculaire. D'autres mesures avec des effectifs possédant des génotypes mieux choisis pourraient permettre de compléter ces résultats.

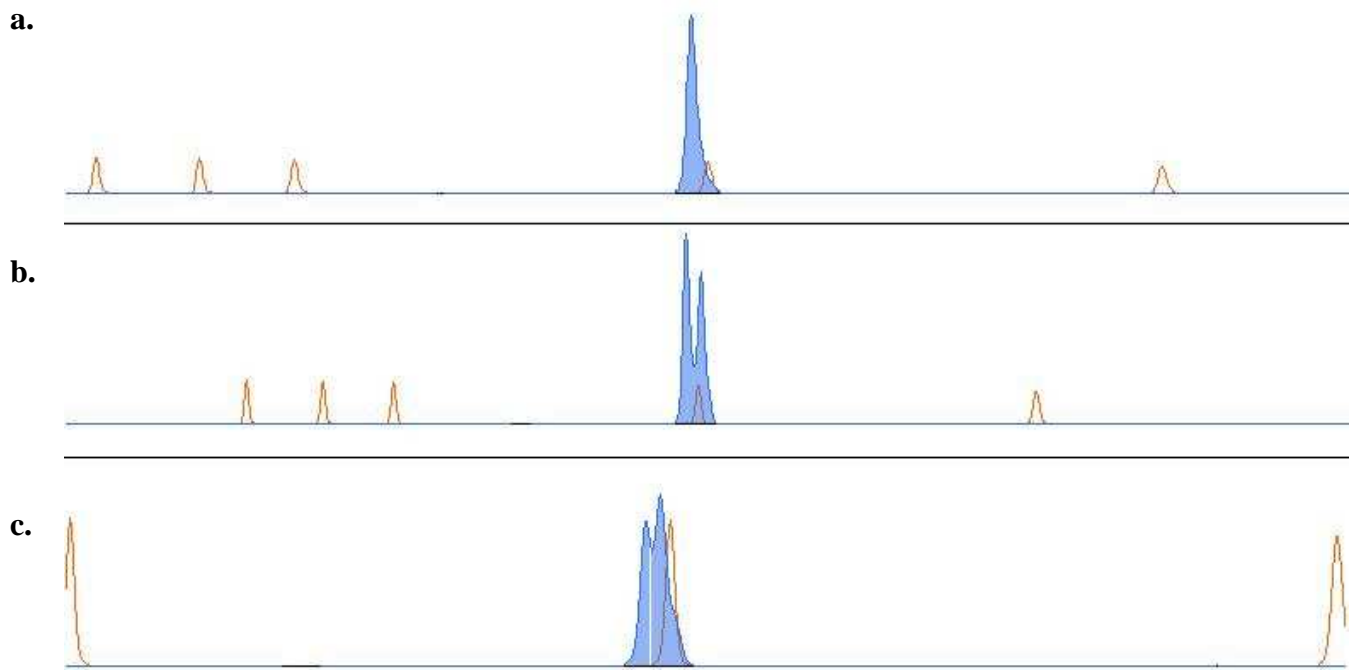


Figure 21 : Génotypage par la méthode d'analyse de fragment. En **a.**, est représenté un individu homozygote avec 7C à cette position, **b.** représente un hétérozygote 7C/9C et **c.** un hétérozygote 7C/8C.

De plus, le génotypage d'autres polymorphismes dans cette région pourrait montrer une association encore plus évidente. Même si ce gène est associé au glycogène chez le bovin, nous n'avons cependant pas mis en évidence de relation avec la perte en eau.

#### 1.6. Génotypage de la région promotrice.

Aucune association n'a été observée avec le polymorphisme en position 698 provoquant une insertion/délétion dans la région promotrice. Afin de génotyper ce polymorphisme sur un nombre plus important d'individus, nous avons mis en place une méthode de génotypage par analyse de fragment similaire à celle utilisée pour le génotypage des micro-satellites. Cette méthode permet de caractériser des fragments variables entre eux par la présence d'une base de différence, et a pu être utilisée ici pour faire le génotypage de cette insertion/délétion (Figure 21).

#### 1.7. Génotypage de plusieurs races pour une étude haplotypique.

Les 12 SNP génotypés chez les veaux de race Holstein (Figure 18), pour l'étude d'association avec des caractéristiques de la viande, ont été utilisés pour réaliser le génotypage d'animaux de 3 races françaises (Limousin, Charolais et Holstein) et de 6 races italiennes (Chianina, Marchigianna, Romagnola, Maremmana, Podolica et Piemontese) afin de réaliser une étude d'haplotypes plus complète. En utilisant une cinquantaine d'animaux par race, et 100 pour la race Holstein, on trouve 36 haplotypes différents (Tableau 7). Trois, voire quatre, sont retrouvés en majorité, et 26 sont retrouvés moins de 10 fois. Grâce au logiciel NETWORK v. 3.1, nous avons réalisé une analyse phylogénique des différents haplotypes pour retracer les variations entre les haplotypes (Figure 22). Quatre blocs ont alors été identifiés et apparentés, formant ainsi des haplogroupes.

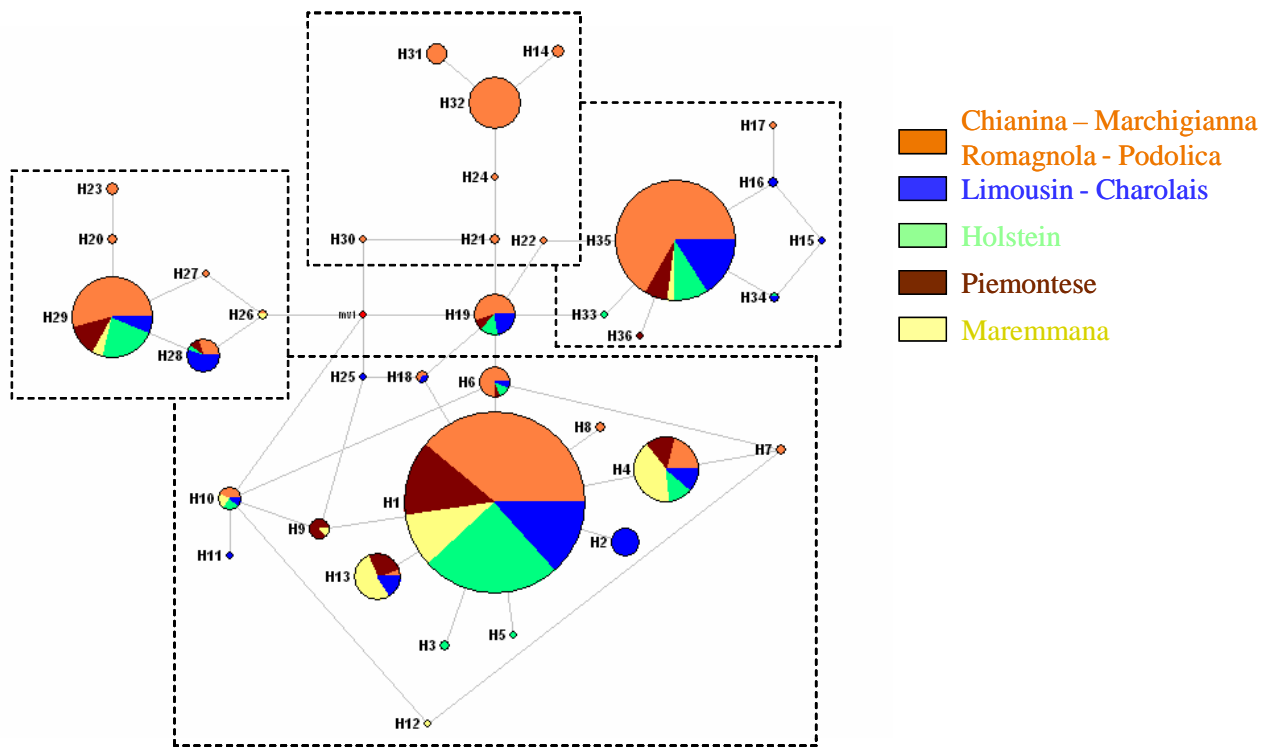


Figure 22 : Représentation de la relation entre les différents haplotypes.

Chaque ligne de connexion entre les groupes fait intervenir un événement unique. Le numéro de l'haplotype est indiqué par **H...** Chaque diagramme a une taille proportionnelle au nombre d'haplotype observé. Les rectangles en pointillés représentent chaque haplogroupe.

Tableau 7 : Distribution de la fréquence des haplotypes par race.

	Haplotypes														N	Chi	Marc	Rom	Mare	Pod	Pie	Lim	Cha	Hol	Moy	
1 (B)	A	G	G	G	G	T	G	C	T	C	C	G	G	G	532	0,33	0,483	0,196	0,447	0,493	0,53	0,488	0,357	0,66	0,443	
35 (K)	G	T	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	233	0,526	0,11	0,186	0,035	0,154	0,114	0,167	0,274	0,11	0,186	
29 (H)	G	.	.	.	A	.	.	.	C	T	.	C	.	T	109	0,036	0,195	0,098	0,044	0,14	0,106	0,036	0,048	0,12	0,091	
4 (D)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	70	0,005	0,025	0,029	0,254	0,059	0,076	0,083	0,012	0,04	0,065	
32	G	.	A	.	.	C	.	T	C	.	.	.	.	.	43	0,041	0,059	0,255		0,015					0,041	
13	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	38	0,005	0,008		0,175		0,076	0,048	0,024		0,037	
19 (G)	G	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	27	0,031		0,078		0,007	0,015	0,06	0,012	0,02	0,025	
28 (I)	G	.	.	.	A	.	.	.	C	T	.	C	.	.	20		0,008			0,037	0,015	0,06	0,071	0,005	0,022	
6 (A)	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	17	0,005	0,017	0,098			0,008	0,012		0,01	0,017	
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	13								0,155		0,017	
10 (F)	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	9		0,008		0,018	0,022		0,012		0,01	0,008	
9	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	8				0,009		0,053				0,007	
31	G	.	A	.	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	8	0,021		0,01		0,022					0,006	
14	.	.	A	.	.	C	.	T	C	.	.	.	.	.	3			0,02		0,007					0,003	
18	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3					0,015		0,012			0,003	
23	G	.	.	.	.	C	.	.	C	T	.	C	.	T	3		0,025								0,003	
3 (C)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	2									0,01	0,001	
7	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	2			0,02							0,002	
8	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	2		0,008			0,007					0,002	
16	.	T	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	2							0,012	0,012		0,003	
20	G	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	C	.	T	2		0,008			0,007					0,002	
21	G	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	2		0,017								0,002	
26	G	.	.	.	A	.	.	.	C	T	.	.	.	.	2				0,009	0,007					0,002	
34 (J)	G	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	2								0,012	0,005	0,002	
5 (E)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	1									0,005	0,001	
11	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	T	.	1								0,012		0,001	
12	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	T	.	.	.	1				0,009						0,001	
15	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	1							0,012			0,001	
17	.	T	.	.	.	.	T	.	C	.	T	.	.	.	1					0,007					0,001	
22	G	.	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	.	1		0,008								0,001	
24	G	.	.	.	.	C	.	T	C	.	.	.	.	.	1			0,01							0,001	
25	G	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1								0,012		0,001	
27	G	.	.	.	A	.	.	.	C	T	.	.	.	T	1		0,008								0,001	
30	G	.	.	.	A	.	.	T	C	.	.	.	.	.	1		0,008								0,001	
33 (K)	G	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	1									0,005	0,001	
36	G	T	.	.	A	.	T	.	C	.	.	.	.	.	1						0,008					0,001
	1428	2260	2337	2339	2343	2528	2547	2596	2643	3451	3718	3869	4695	5851		97	59	51	57	68	66	42	42	100		
	Position des SNPs														Nombre d'animaux											

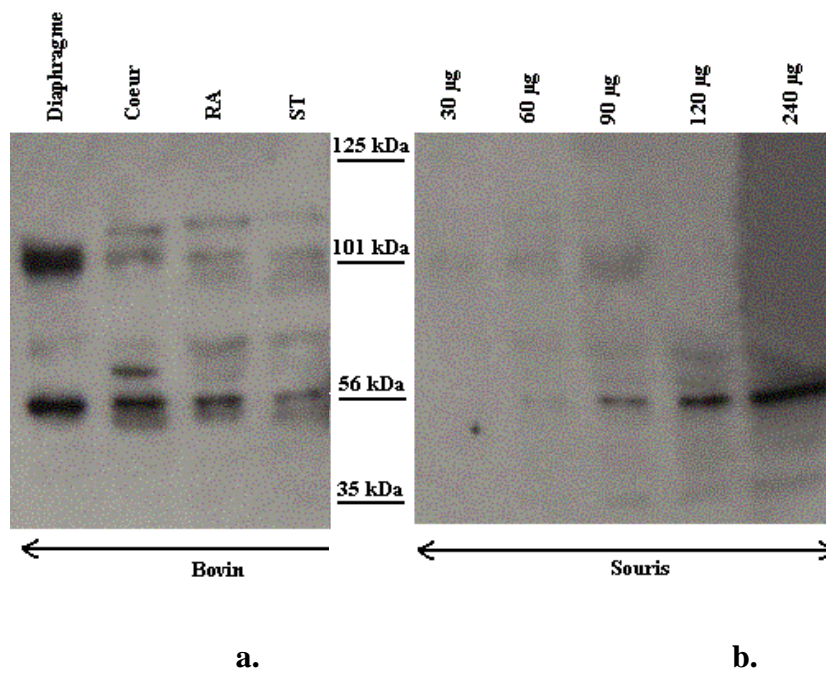


Figure 23 : Localisation tissulaire de la protéine  $\gamma_3$  par Western blot.

La migration des protéines s'effectue sur un gel SDS-PAGE 12 %. La protéine  $\gamma_3$  est révélée par Western blot par un anticorps anti-  $\gamma_3$  murin. **a.** Distribution de la protéine  $\gamma_3$  dans différents tissus bovins. Pour chaque tissu 60 µg de protéines sont déposés. **b.** Témoin murin avec des quantités de protéines allant de 30 µg à 240 µg. La protéine  $\gamma_3$  migre à une taille d'environ 56 kDa. L'anticorps anti- $\gamma_3$  murin révèle un signal dans tous les tissus bovins analysés et dans le témoin de souris à une taille d'environ 56 kDa.



## 2. Etude fonctionnelle de la protéine codée par le gène *PRKAG3*.

### 2.1. Introduction

Afin d'établir si les types de variations génétiques du gène *PRKAG3* (polymorphismes et épissages alternatifs) jouent un rôle sur l'activité enzymatique du complexe AMPK nous avons entrepris une étude fonctionnelle de la protéine codée par le gène *PRKAG3*.

Le meilleur moyen pour montrer des différences d'activité dues au seul complexe AMPK est de le produire dans un système d'expression, et de réaliser un test d'activité enzymatique sur ce complexe. Nous avons donc cherché à produire différentes protéines recombinantes correspondantes aux différents variants du gène *PRKAG3* observés chez le bovin. La protéine  $\gamma_3$  étant une sous unité régulatrice de l'enzyme AMPK, il était bien sur nécessaire de produire également les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  et de reconstituer un trimère fonctionnel.

### 2.2. Résultats

Avant de produire la sous-unité  $\gamma_3$ , nous avons testé l'anticorps anti- $\gamma_3$  dont nous disposions qui nous a été gracieusement fourni par la société Arexis (Möln dal, Suède). L'anticorps est dirigé contre 16 acides aminés de la région C-terminale de la sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK murine. La région reconnue par l'anticorps est spécifique de la sous-unité  $\gamma_3$  et est très conservée entre les espèces : sur les 16 acides aminés de l'épitope, 14 sont conservés dans la protéine bovine. Les protéines totales ont été extraites de différents tissus (cœur, diaphragme, muscles RA et ST) d'un même individu bovin de race Charolaise afin d'identifier la protéine  $\gamma_3$  par Western blot. Les protéines ont été séparées en gel de polyacrylamide 12% de manière à bien identifier les protéines dans la région d'intérêt (environ 56 kDa). Afin de confirmer la réelle présence de la sous-unité, nous avons utilisé comme témoin positif une gamme croissante de protéines totales de muscle de souris. Les temps de révélation varient de 1 minute pour le Western blot murin à 3 minutes pour le Western blot bovin. Nous observons la présence d'un signal à une taille d'environ 56 kDa dans le muscle de souris, qui correspond à la taille de la protéine attendue. Ce signal est présent à la même taille chez le bovin dans les différents tissus y compris dans le cœur où le signal est intense (Figure 23). Nous observons de plus chez le bovin des bandes supplémentaires probablement dues à une reconnaissance croisée non spécifique.

Trois autres anticorps ont été testés. L'un est un anticorps commercial généré grâce à un peptide synthétique sélectionné dans la région N-terminale de la protéine humaine (Abgent). Les résultats obtenus avec cet anticorps sont similaires à ceux obtenus avec l'anticorps anti- $\gamma_3$  murin.

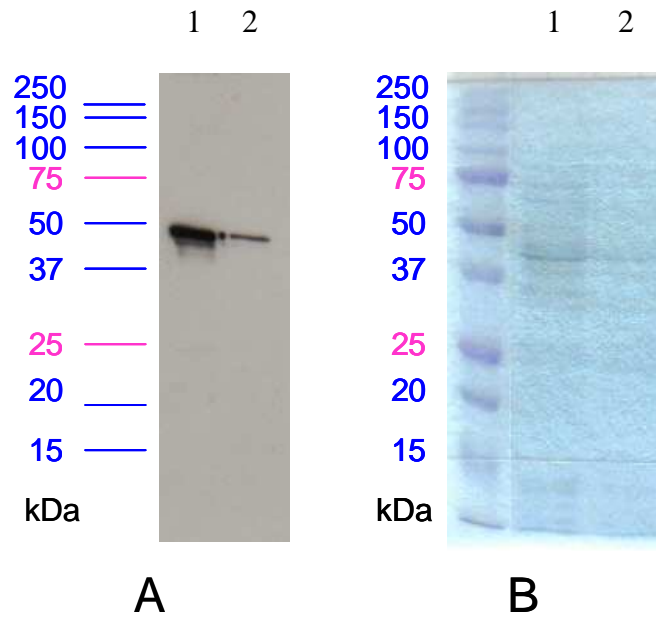


Figure 24 : Production de la protéine  $\gamma_3$  en système RTS.

Western blot (A) et gel de Coomassie (B). Les deux pistes correspondent aux deux constructions testées (Présence (piste 1) ou absence (piste 2) d'un Tag Histidine).

Les deux autres sont des anticorps anti-peptides générés contre les formes courtes et longues de la protéine bovine. Ces deux derniers peptides ont été synthétisés de manière à produire un anticorps spécifique des formes courtes et longues, dues aux épissages alternatifs différents entre les exons 1 et 2. Ces peptides ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique). Les anticorps ont été réalisés par immunisation chez le lapin par l'équipe du Dr Ahmed Ouali (INRA, Clermont-Ferrand/Theix). Malheureusement, nous n'avons pas pu utiliser ces deux anticorps car ils n'ont pas permis d'obtenir un signal spécifique des deux formes protéiques, et de plus ils reconnaissent un nombre trop important de protéines.

Comme nous ne disposions pas d'un anticorps réellement spécifique de la protéine  $\gamma_3$  bovine, nous avons alors décidé de produire une protéine complète pour immuniser des animaux et nous avons choisi le système de transcription *in vitro* (RTS, Roche) qui permet d'obtenir une protéine pure. La production en système *in vitro* nécessite le clonage de la séquence nucléotidique correspondante dans un vecteur adapté, puis les réactions de transcription et de traduction se produisent dans un milieu contenant tout le matériel enzymatique et moléculaire nécessaire. Deux constructions ont été testées, l'une étant l'ADNc codant pour la protéine bovine normale, la deuxième correspondant à celui codant la protéine bovine auquel a été rajouté une séquence nucléotidique codant pour un Tag Histidine en N-terminal de la protéine. Afin de vérifier si la protéine a été produite, les extraits obtenus ont été analysés sur gel par coloration au bleu de Coomassie et par Western blot grâce à l'anticorps anti- $\gamma_3$  murin (Figure 24). Le gel coloré au bleu de Coomassie révèle une quantité faible de protéine dans l'extrait. Cependant, grâce au Western blot, on peut constater que la protéine  $\gamma_3$  bovine a été produite. L'extrait brut après production contient 500  $\mu\text{g}$  de protéines totales. La protéine  $\gamma_3$  est en quantité trop faible pour produire un anticorps spécifique de celle-ci sans purification. Cependant les quantités obtenues sont également trop faibles pour envisager une production d'anticorps à partir d'une seule production. Il aurait fallu 10 productions en système RTS afin d'obtenir la quantité de protéine (non purifiée) nécessaire pour produire un anticorps, avec la purification il aurait été nécessaire de faire le double de production. De la même manière, les quantités sont trop faibles pour réaliser une étude de son activité biologique et de son affinité pour l'activateur de cette enzyme l'AMPK. Cette éventualité a été abandonnée du fait de son coût mais aussi de son manque d'efficacité.

La production *in vitro* étant inadaptée à une production conséquente de la protéine, il a été nécessaire d'utiliser un modèle capable de donner des quantités plus importantes de protéine, dans

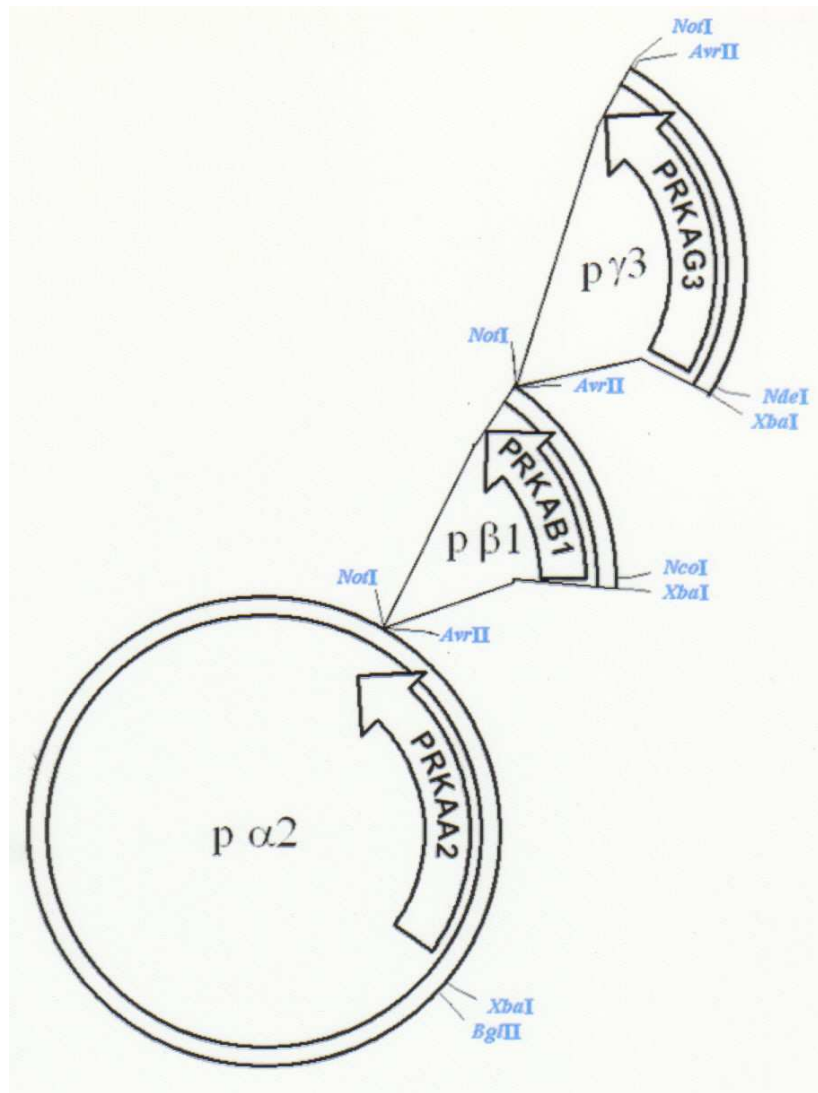
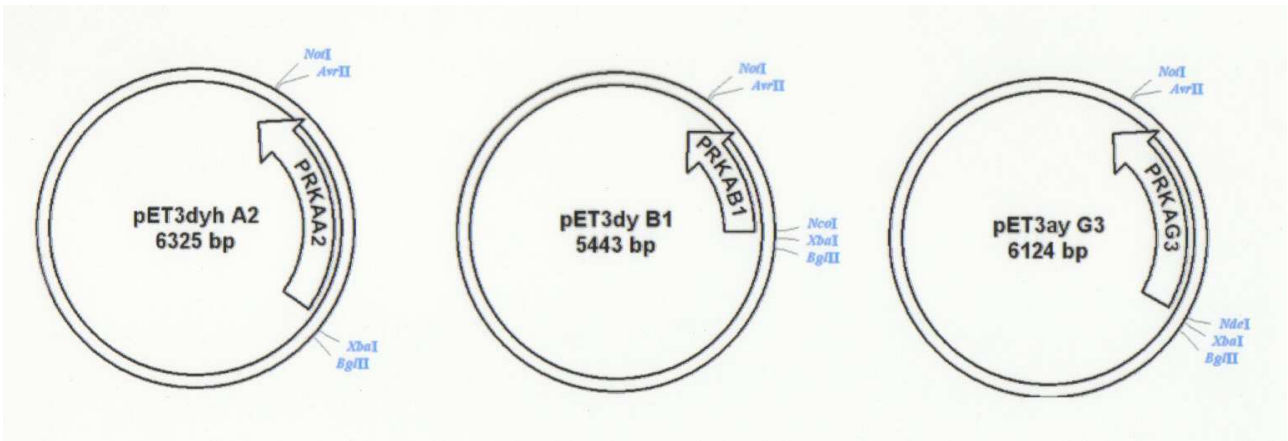


Figure 25 : Stratégie de clonage des 3 sous-unités de l'AMPK pour l'expression par la bactérie.

le but d'obtenir un anticorps spécifique. Le système qui présentait les plus grands avantages était le système procaryote.

D'autre part, il a été montré que les trois sous-unités  $\alpha_1\beta_1\gamma_1$  s'assemblaient parfaitement à l'intérieur de la bactérie *E. coli* pour donner un complexe recombinant fonctionnel (Neumann *et al.*, 2003). Le système procaryote nous est alors apparu comme la solution pour produire également des complexes AMPK complets.

Différents vecteurs d'expression ont été construits avec les trois gènes codant pour les trois sous-unités afin d'exprimer ces gènes dans la bactérie (Figure 25). Nous avons utilisé pour cela les sous-unités  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  et différentes isoformes de  $\gamma_3$  bovines. Les cDNA codant les différentes sous-unités bovines ont été amplifiés par PCR et clonés dans un vecteur d'expression bactérien, le vecteur pET3d pour les sous-unités  $\alpha_2$  et  $\beta_1$  ou pET3a pour les différentes isoformes  $\gamma_3$  choisies. Les différentes isoformes  $\gamma_3$  (Tableau 8) correspondent aux formes longues ou courtes des transcrits ainsi qu'à la présence de polymorphismes provoquant un changement en acide aminé.

**Tableau 8 :** Production de 9 plasmides recombinants codant pour différentes isoformes de la sous-unité  $\gamma_3$ . Chaque plasmide présente l'absence ou non des insertions ainsi que des variations au niveau de SNP provoquant des changements en acides aminés au niveau de la protéine. Ins 1 indique la présence ou l'absence des 18 nucléotides supplémentaires entre les exons 1 et 2, du à l'épissage alternatif, Ins 2 indique la présence ou non des 3 nucléotides entre les exons 9 et 10. Les SNPs entraînant un changement d'acide aminé sont indiqués en bleu.

Plasmides	Ins 1	G/T 2260	G/C 2339	G/A 2343	C/T 3451	C/T 3718	C/G 3869	Ins 2	G/T 4649	C/T 4695	C/T 4738	T/C 6605	A/G 6608	T/C 6668
L593.P4	N	G	G	G	C	C	G	N	G	C	C	T	A	T
L593.P19	O	G	G	G	C	C	G	N	G	C	C	T	A	T
L593.P15	N	G	G	G	C	C	G	O	G	C	C	T	A	T
L590.P6	O	G	G	G	C	C	G	O	G	C	C	T	A	T
A4b.P3	N	T	G	G	C	C	G	N	G	C	T	C	A	T
REB.P9	N	G	C	G	C	C	G	N	G	C	C	T	A	T
L593.P7	N	G	G	G	C	T	G	N	G	C	C	T	A	T
C582.P2	N	G	G	G	C	C	G	N	T	C	C	T	A	T
L590.P3	N	G	G	G	T	C	G	N	G	T	C	C	G	C



Chaque ADNc, codant pour les différentes sous-unités, a tout d'abord été cloné seul dans le vecteur, puis associé aux autres ADNc au sein d'un même vecteur polycistronique afin d'obtenir un seul plasmide à intégrer dans la bactérie. Ce vecteur d'expression bactérienne obtenu a été utilisé pour transformer des bactéries compétentes de type *E. coli* BL21. Avant toute tentative de production, le vecteur a été séquencé en totalité afin de vérifier qu'il n'y avait eu aucun phénomène de mutation ou de recombinaison sur celui-ci pouvant perturber la transcription et/ou la traduction. Le système entièrement vérifié, les clones bactériens possédant le vecteur ont été induits à l'IPTG afin de produire les différentes protéines. Nous avons pu noter une différence dans la vitesse de croissance des bactéries, les bactéries possédant le vecteur contenant les trois inserts ont montré une croissance très ralentie comparativement à des bactéries possédant un vecteur sans insert ou encore à des bactéries non transformées. Après induction, l'analyse des extraits protéiques des bactéries transformées avec le vecteur possédant les différentes sous-unités n'a montré aucune différence avec ceux des bactéries non transformées ou transformées avec un vecteur vide. Un temps d'induction plus important n'a pas permis non plus d'arriver à une production dans ce système procaryote. Des tests de production de la sous-unité  $\gamma_3$  seule ont été réalisés afin de voir si celle-ci était un obstacle à la production du complexe. De la même manière, les bactéries ont été incapables de produire la sous-unité  $\gamma_3$  seule. La production des trois sous-unités et celle de la protéine  $\gamma_3$  seule ont été réalisées en parallèle. Cette absence de production peut être due à la présence de codons rares pour la bactérie dans la séquence bovine utilisée. En effet, bien que le code génétique soit redondant, la totalité des codons n'est pas utilisée dans un organisme (Comeron et Aguadé, 1998). L'usage des codons d'un organisme à un autre s'en trouve changé, notamment entre les mammifères et la bactérie. Les premiers codons de l'ADNc de la sous-unité  $\gamma_3$  ont été changés en utilisant des amorces modifiées sur les codons rares. Cependant, même après un changement des codons rares pour la bactérie, notamment au début de la séquence codante, la protéine n'a pu être produite. Neumann *et al.* (2003) n'ont pas réussi non plus à produire la sous-unité  $\gamma_3$  dans un système procaryote (résultats non publiés). Quelque chose dans la protéine semble être néfaste à la bactérie, empêchant ainsi sa production. Cela peut venir de sa structure ou de son repliement qui perturbe le bon fonctionnement du métabolisme bactérien, et qui va entraîner sa dégradation ou sa non-production.

Ne disposant pas d'anticorps anti- $\alpha_2$  ou anti- $\beta_1$  bovin, il a été impossible de vérifier si les autres sous-unités étaient produites ou non. Cependant aucune sur-expression n'a été détectée aux tailles attendues de celles-ci.

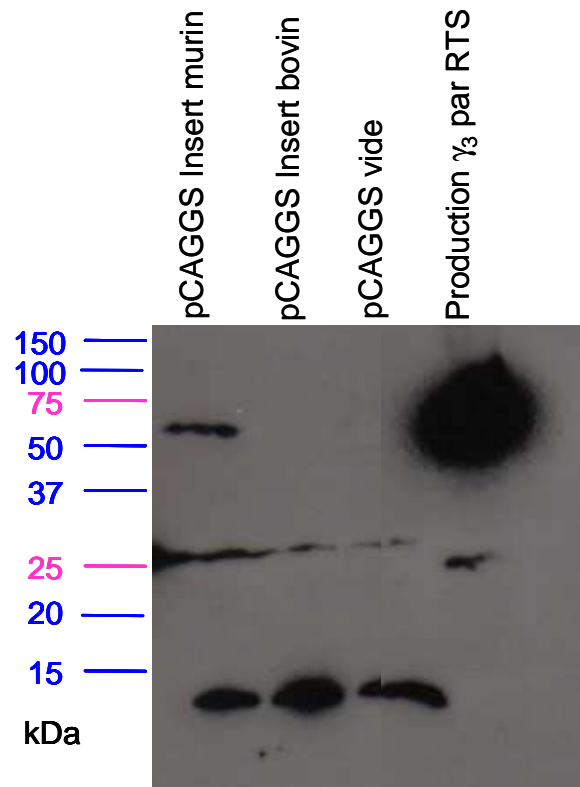


Figure 26 : Production de la sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK par transfection de cellules HEK 293.

Les cellules ont été transfectées avec un plasmide contenant l'insert codant la protéine de souris (piste 1), l'insert codant la protéine bovine (piste 2), avec un plasmide vide (piste3). La piste 4 contient l'extrait brut de production de la sous-unité  $\gamma_3$  par système in vitro. Pour chaque piste 30  $\mu$ g de protéines ont été déposées.



Devant l'échec de la production du complexe AMPK en système procaryote, nous avons tenté une production dans des cellules de mammifères (HEK 293 et Cos 7). Tout d'abord, seul l'cDNA codant la sous-unité  $\gamma_3$  a été cloné. Les sites de clonage du vecteur d'expression eucaryote étant différents du vecteur pET, il a été nécessaire de réamplifier la protéine bovine à l'aide d'amorces possédant les sites de coupures enzymatiques adéquates. L'ADNc de l'isoforme la plus courante de la sous-unité (sans la présence d'insertion) a été amplifié par PCR puis inséré dans le vecteur pcDNA 3.1. Après vérification du vecteur, les cellules Cos 7 et HEK 293 ont été transfectées avec le vecteur pcDNA 3.1 contenant l'insert codant la protéine  $\gamma_3$  bovine. L'extrait cellulaire brut a été analysé par Western blot, et aucune expression n'a été détectée dans les deux types cellulaires. L'utilisation d'un témoin positif, correspondant à une protéine déjà produite au sein du laboratoire, a permis d'éliminer l'hypothèse d'une mauvaise manipulation des souches cellulaires. Le problème demeure, la protéine PRKAG3 n'a pas pu être produite. Soit cela provient d'une erreur de construction du vecteur, soit cela provient d'une particularité de la protéine bovine. La construction du vecteur a été vérifiée plusieurs fois, ceci permettant d'exclure cette hypothèse. Après contact avec d'autres équipes travaillant sur l'AMPK, nous avons obtenu un plasmide pCAGGS contenant un insert codant la protéine  $\gamma_3$  murine. Ce plasmide a été utilisé tel quel, mais également modifié, l'insert murin a été remplacé par la séquence bovine du gène, pour transfecter des cellules HEK 293. Les extraits protéiques bruts ont alors été analysés par Western blot (Figure 26). La protéine murine a été produite par les cellules, une bande d'environ 55 kDa est retrouvée à la même taille que lors de la production de la protéine bovine par RTS. En revanche, il n'y a aucune production de la protéine bovine.

Bien que les protéines bovines et murines partagent 81% d'homologie, la protéine bovine doit posséder un élément empêchant sa production, ou favorisant sa dégradation. Si tel est le cas, cet élément de structure ne peut être situé que dans la région N-terminale de la protéine, la première partie de la protéine (environ 160 acides aminés) étant assez différente entre les deux espèces, alors que le reste est fortement conservé. Une autre possibilité, pour expliquer cette absence de production, réside dans le fait que les cellules utilisées ne sont pas des cellules musculaires. La sous-unité  $\gamma_3$  est exprimée principalement dans les cellules musculaires, mais bien que la majorité des productions de cette sous-unité se fasse dans des lignées L6 de myoblastes, elle a par ailleurs été produite dans des lignées non musculaires comme la lignée COS (Barnes *et al.*, 2004).

La production des différentes isoformes n'ayant pas abouti, nous avons envisagé l'utilisation d'extraits protéiques totaux bovins pour réaliser des tests d'activité sur le complexe AMPK. Ce test

d'activité consiste en la phosphorylation d'un peptide de synthèse par l'AMPK. De l'ATP radioactif est utilisé pour suivre cette phosphorylation qui consiste en un transfert un phosphate radioactif de l'ATP sur le peptide de synthèse (Musi *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2003). Des animaux présentant des allèles différents pour plusieurs SNPs, provoquant les changements en acide aminé suivant : A121S, W147S, R256W, D351Y, T366M, ont été utilisés. L'AMPK pour être fonctionnelle doit être activée, c'est-à-dire phosphorylée. LKB1 est capable de phosphoryler l'AMPK *in-vitro* (Shaw *et al.*, 2004). Les tests d'activité sur les échantillons protéiques sont réalisés après une incubation préalable en présence de LKB1 (Upstate) et d'ATP. Aucune activité enzymatique du complexe AMPK n'a pu être détectée sur ces échantillons (Tableau 3). Le lysat cellulaire n'étant pas seulement constitué de l'AMPK, d'autres enzymes peuvent bloquer l'action de l'AMPK. La présence de phosphatases dans le milieu peut provoquer une inactivation du complexe enzymatique par déphosphorylation de la Thréonine 172. Les différentes sous-unités de l'AMPK ne possédant pas de Tag particulier *in vivo*, il est nécessaire de sélectionner l'une des différentes sous-unités et de réaliser une immuno-précipitation du complexe. Le complexe a été immuno-précipité à l'aide de l'anticorps anti- $\gamma_3$  dont nous disposons (Tableau 9). Malgré cette étape d'immuno-précipitation, aucune activité n'a été détectée.

Tableau 9 : Résultats des tests d'activité réalisés sur trois échantillons (H97, L501 et C617) avant et après immunoprécipitation. En plus des différents échantillons, les témoins PE (AMPK commerciale), NS (substrat absent) et NE (absence d'enzyme) ont été ajoutés.

Tubes	Echantillons	Activité (cpm)
1	H97	90
2	L501	98
3	C617	113
4	H97 IP	130
5	L501 IP	125
6	C617 IP	153
7	PE	22482
8	NS	255
9	NE	386

Cette absence d'activité dans les échantillons immuno-précipités peut être due à un manque de spécificité de l'anticorps. L'anticorps anti- $\gamma_3$  utilisé présente une spécificité moyenne vis-à-vis de la protéine  $\gamma_3$  bovine dans un extrait de protéine totale (Figure 23a). L'étape de fixation de l'anticorps sur la protéine est une étape déterminante de l'immuno-précipitation. L'utilisation d'un anticorps peu spécifique entraîne un mauvais accrochage de la protéine d'intérêt. L'immuno-précipitation n'ayant pas fonctionné, il est normal de ne pas observer d'activité.

### 3. Les autres gènes de la famille AMPK bovine

#### 3.1 Introduction

Lorsque j'ai débuté l'étude sur l'AMPK bovine, seule la séquence du gène *PRKAG1* était connue chez le bovin. En revanche, les structures complètes des 7 gènes étaient disponibles dans les autres espèces (homme, souris, porc). McKay *et al.* (2003) avaient positionnés les différents gènes de l'AMPK sur le génome bovin. Pour réaliser l'expression du complexe AMPK bovin, les séquences d'une des sous-unités  $\alpha$  et de l'une des sous-unités  $\beta$  était nécessaire. J'ai donc entrepris la détermination de la structure et de la séquence des différents gènes bovins. L'expression des différents gènes dans les autres espèces varie selon les tissus, le gène *PRKAG3* étant exprimé principalement dans le muscle (Milan *et al.*, 2000). Aucune analyse complète de l'expression de l'AMPK n'ayant été réalisée chez le bovin ou dans toute autre espèce, et comme les séquences bovines de ces gènes avaient été établies, nous avons envisagé une étude de leurs expressions tissulaires.

#### 3.2. Résultats

##### 3.2.1. Identification des différents gènes bovins de l'AMPK

En prenant appui sur les séquences disponibles, par comparaison de séquences entre les EST bovines et les séquences génomiques humaine, murine et porcine, j'ai tout d'abord déterminé les structures putatives des différents gènes bovins. Des amorces bovines ont pu être déterminées dans les exons putatifs bovins. La structure des différents gènes bovins a été établie. Les séquences codantes des différents gènes ont été déterminées par analyse des banques d'EST, séquençage et RACE-PCR. Les séquences suivantes, issues des banques d'EST, ont été utilisées comme point de départ pour l'identification des différents gènes de l'AMPK bovine. BG358445 et AV617168 pour *PRKAA1*, BM254702 pour *PRKAA2*, BF043481 et BF043876 pour *PRKAB1*, AF329081 pour *PRKAG1* et BE846246, AW670054 et AV594806 pour *PRKAG2*. Pour ce qui est de *PRKAB2*, aucune information de séquence n'était disponible. McKay et Womack (2002) ont cartographié les différents gènes bovins de l'AMPK. Ils ont pu nous fournir un fragment de séquence d'environ 100 pb correspondant au gène *PRKAB2* bovin. Après vérification de ces séquences, les extrémités de chaque transcrits ont pu être caractérisées par 5' et 3' RACE-PCR. La structure codante ainsi établie, nous avons confirmé par comparaison avec la séquence génomique, la structure des différents gènes. Les gènes bovins codant les différentes sous-unités de l'AMPK ont une structure comparable à ceux des autres espèces. Toutes les jonctions exons/introns répondent à la règle

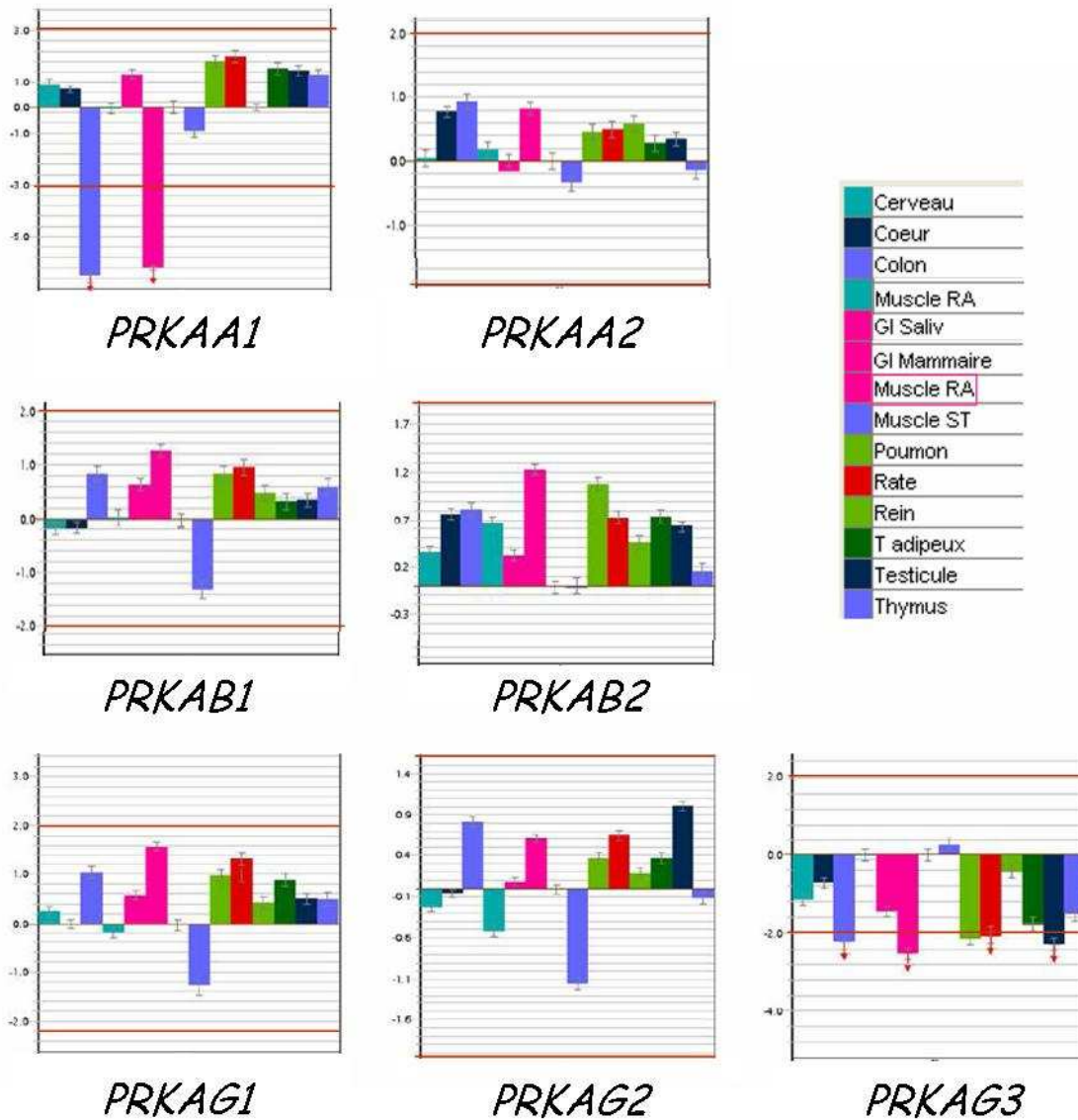


Figure 27 : Résultats de quantification des différents gènes de l'AMPK dans différents tissus.

Dans chaque cas, le muscle RA (encadré en rose) est utilisé comme référence. La significativité de variation d'expression est fixée à une variation d'une valeur de 2 en sur ou sous-expression.

GT/AG (Shapiro et Senapathy, 1987). Seuls les grands introns d'environ 20 kb n'ont pas été séquencés en totalité.

Une fois les séquences des différents gènes déterminées, une recherche de polymorphismes dans les différents gènes des sous-unités de l'AMPK bovine a été réalisée. A l'inverse du gène *PRKAG3* riche en polymorphismes, les autres gènes bovins présentent peu de polymorphismes, un SNP a été identifié sur le gène *PRKAA1*, 4 sur *PRKAA2*, 1 sur *PRKAB1*, 6 sur *PRKAB2*, 3 sur *PRKAG1* et 4 sur *PRKAG2*. Cette recherche de polymorphismes, dans les différents gènes, a été effectuée de la même manière que pour *PRKAG3*, en analysant les profils électrophorétiques sur SSCP de 32 bovins de 16 races européennes. Pour chaque gène, cinq régions d'environ 500 pb chacune ont été analysées. Moins de polymorphismes ont été identifiés car ces gènes ont également fait l'objet d'une étude moins approfondie que *PRKAG3*. Pour le gène *PRKAG3*, cette première recherche de SNP sur ces mêmes individus avait quand même permis la caractérisation d'un plus grand nombre de polymorphismes.

### 3.2.2. Quantifications des transcrits des différents gènes chez le bovin.

Les régions codantes de chaque gène ayant été identifiées, j'ai entrepris une quantification des différents transcrits dans plusieurs tissus bovins. Les séquences possèdent un fort taux d'homologie entre gènes d'une même sous unité. Des amorces bovines spécifiques de chaque sous-unité ont été utilisées pour l'étude de l'expression tissulaire.

Les tissus utilisés ont été extraits à partir du même animal de race Charolaise. Chaque tissu a été analysé en triplicat en utilisant comme le gène *GAPDH* comme gène contrôle. Dans chacune des expériences, le tissu de référence qui a été pris est le muscle *Rectus abdominis* (RA). Un second tissu *Rectus abdominis* provenant d'un autre animal de race Charolaise a été utilisé en comparaison. Les résultats de quantification sont répertoriés dans la figure 27.

Dans le gène *PRKAA1*, on observe une sous-expression du gène dans le colon et la glande mammaire par rapport au muscle RA. Pour le gène *PRKAG3*, l'expression est moindre dans les différents tissus par rapport au muscle RA et ST, mais de plus, on trouve une sous-expression statistiquement significative dans le colon, la glande mammaire, la rate et le testicule.

Pour les autres gènes, les variations observées sont considérées comme non significatives.



## 4. Etude du gène *PPARG* bovin et mise en évidence de transcrits chimères

### 4.1. Introduction

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de travailler sur un projet en parallèle du projet sur l'AMPK bovine. Ce projet concerne le gène *PPARG* et s'inscrit dans un appel d'offre de type AQS (Aliment Qualité Sécurité) financé par le Ministère de la Recherche. Ce projet, piloté par Jean-Francois Hocquette de l'INRA de Clermont Ferrand, avait pour objectif de déterminer les différences métaboliques et génétiques associées à la variabilité du persillage de la viande bovine dans deux races présentant des phénotypes extrêmes pour ce caractère (Limousine et Angus). Plusieurs approches étaient envisagées regroupant des analyses métaboliques, des mesures d'activité enzymatiques, des mesures de l'expression de certains gènes clés du métabolisme glucidique et lipidique et une analyse fine des transcrits et du polymorphisme d'un groupe de gènes. Cette dernière analyse a mis en évidence des résultats intéressants concernant un gène, le gène *PPARG*, jouant un rôle important dans le métabolisme des tissus musculaires et adipeux. Ce sujet étant proche de mes préoccupations dans le domaine du déterminisme génétique de la qualité de la viande bovine, j'ai accepté d'y participer afin d'élargir les résultats obtenus dans le cadre du contrat AQS. En effet, l'AMPK et les protéines codées par le gène *PPARG* sont impliquées dans le contrôle d'un certain nombre de voies métaboliques communes. L'AMPK, mais surtout la sous unité  $\gamma_3$ , est essentielle dans la modulation transcriptionnelle de certains gènes essentiels dans la voie du métabolisme du glucose et des lipides dans le muscle squelettique (Barnes *et al.*, 2004). L'AMPK et les  $PPAR\gamma$  sont impliqués dans l'adaptation cellulaire face aux changements métaboliques. L'utilisation de souris transgéniques exprimant la mutation du phénotype RN<sup>-</sup> porcin (Tg-*Prkag3*<sup>225Q</sup>) a montré une augmentation de l'expression du taux de transcrits du gène *PPARG* dans le muscle gastrocnémien en condition d'alimentation normale ou de jeun (Long *et al.*, 2005). De plus, les récepteurs  $PPAR\gamma_1$  et  $PPAR\gamma_2$  ont un rôle majeur dans la mise en place et le métabolisme du tissu adipeux. L'importance du tissu adipeux intra-musculaire est un facteur important pour la qualité de la viande bovine.

### 4.2. Résultats

L'analyse des transcrits du gène *PPARG* bovin a révélé des informations intéressantes. Nous avons identifié des transcrits chimériques bovins résultant de la cotranscription et de l'épissage alternatif de 2 gènes voisins, *PPARG* et *TSEN2*. Ces deux gènes codent respectivement pour les récepteurs  $PPAR\gamma_1$  et  $PPAR\gamma_2$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) et pour l'homologue de l'endonucléase 2 d'épissage des ARNt. Ils sont situés dans la même orientation, à environ 50 kb

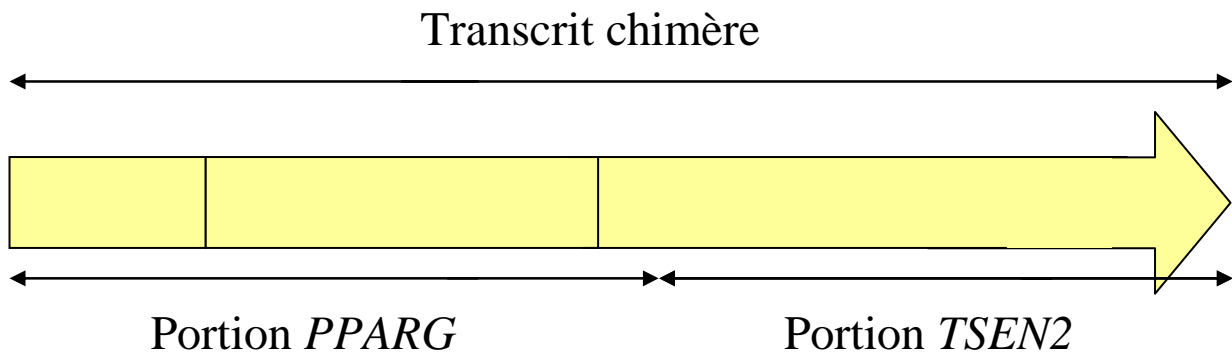


Figure 28 : Clonage du transcrit chimère.

Le transcrit chimère a été cloné en trois fragments dans le vecteur d'expression pcDNA 3.1.

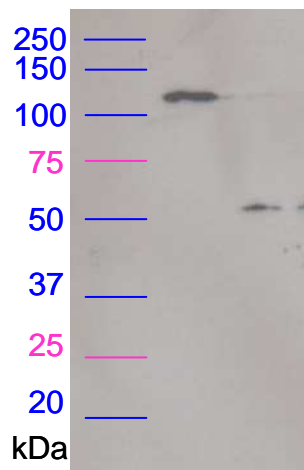


Figure 29 : Western blot sur la protéine PPARG.

A gauche est déposé l'extrait protéique des cellules COS7 transfectées avec le plasmide contenant le transcrit chimère. A droite est déposé un extrait brut de foie.



de distance sur le chromosome 22q24 bovin. Leurs positions relatives sont conservées chez l'homme et chez la souris. Nous avons identifié deux types de transcrits chimériques contenant la totalité sauf le dernier exon du gène *PPARG* suivi de la totalité des exons du gène *TSEN2* hormis l'exon 1. Les deux transcrits chimères diffèrent par la présence/absence d'un exon intermédiaire résultant de la transcription d'une séquence LINE L2 située entre les deux gènes. Les transcrits utilisent des sites d'épissage consensuels pour tous les exons de chacun des 2 gènes, ainsi que pour la séquence LINE L2. Un de ces transcrits présente un codon stop prématuré et l'autre code une protéine chimérique putative constituée de la majorité de la protéine PPAR $\gamma$  et de la protéine TSEN2 entière. Bien que la présence de ces transcrits ait été montrée par amplification PCR sur des ADNc totaux chez le bovin, nous n'avons cependant pu établir par Western blot l'existence dans les tissus de cette protéine chimérique en utilisant un anticorps anti-PPAR $\gamma$ .

En montrant qu'à la fois les transcrits individuels et les transcrits chimériques sont transcrits à partir des gènes *PPARG* et *TSEN2*, nous avons mis en évidence une régulation complexe de la terminaison de la transcription. L'existence et la fonction d'une protéine chimère constituée de motifs actifs qui n'ont, à priori, aucune relation, ne sont qu'une simple hypothèse.

Ces résultats sont décrits dans le deuxième article : Cotranscription and intergenic splicing of the *PPARG* and *TSEN2* genes in cattle. (BMC Genomics. 2006; 7: 71.)

Puisque nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence *in vivo* de la protéine chimère, nous avons tenté de la produire *in vitro* grâce à un système d'expression eucaryote. Pour cela, le transcrit chimérique *PPARG-TSEN2* a été cloné, puis inséré dans le vecteur d'expression pcDNA 3.1 (Figure 28) afin de réaliser une expression de façon transitoire dans les cellules COS7.

L'extrait protéique brut a ensuite été utilisé pour réaliser un Western blot afin de voir si cette protéine chimérique est produite dans la cellule. En utilisant l'anticorps anti-PPAR $\gamma$ , nous avons pu mettre en évidence la production de la protéine chimérique par les cellules (Figure 29). Le témoin positif d'extrait de foie indique la présence de protéine PPAR $\gamma$ , les protéines chimériques n'étant pas visualisables par Western blot *in vivo*.

Le fait que le transcrit chimère puisse être traduit en système eucaryote montre que ce transcrit est fonctionnel et que la protéine produite est tolérée par une cellule eucaryote. La production d'une telle protéine peut être utilisée afin de produire un anticorps spécifique de ce type de protéine. Cela permettra également d'envisager une étude sur la fonction de cette protéine chimère. En effet, le rôle d'une telle protéine présentant des fonctions différentes reste un mystère.

# *Discussion*



Le gène *PRKAG3* bovin est le siège d'une exceptionnelle variabilité.

L'objectif de ce travail de thèse était, d'une part, de mieux comprendre comment s'exprime le gène codant la sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK et, d'autre part, de déterminer des marqueurs génétiques liés aux qualités de la viande chez le bovin. Il s'agissait d'acquérir des connaissances afin de mieux comprendre et/ou tenter d'expliquer la variabilité observée dans le stockage du glycogène musculaire. Ce projet de thèse a donc conduit à l'établissement de la structure du gène *PRKAG3* bovin, à la détermination des transcrits, à l'identification des isoformes protéiques et de leur correspondance avec les transcrits et enfin à la détermination d'haplotypes. La séquence et la structure génomique du gène *PRKAG3* ont été entièrement déterminées grâce à l'ADN génomique et à l'ADNc de plusieurs échantillons. Elle est identique à la structure du gène chez la souris, l'homme et le porc, avec un intron supplémentaire en 3' UTR. Généralement, peu de gènes possèdent un intron en 3' UTR (Thermann *et al.*, 1998) car un épissage après le codon de terminaison entraîne une rapide dégradation des ARN messagers par le NMD (Non-sense Mediated mRNA Decay). Nous avons pu mettre en évidence 46 SNPs dont 6 provoquent un changement en acides aminés. Le changement opéré par un SNP peut être soit une transition purine–purine (A  $\leftrightarrow$  G) ou pyrimidine–pyrimidine (C  $\leftrightarrow$  T), soit une transversion purine–pyrimidine ou pyrimidine–purine (A  $\leftrightarrow$  C, A  $\leftrightarrow$  T, G  $\leftrightarrow$  C, G  $\leftrightarrow$  T). D'un point de vue théorique, à chaque position, les quatre bases peuvent être présentes. Cependant en pratique, les SNPs sont en général bi-alléliques. Ceci s'explique par la faible fréquence de substitution d'un seul nucléotide, estimée entre  $1.10^{-9}$  et  $5.10^{-9}$  par nucléotide et par an chez les mammifères (Vignal *et al.*, 2002). La probabilité que deux changements indépendants se produisent à la même position est très faible. Fréquemment, les changements observés lors de ces mutations sont des transitions. L'explication la plus probable est sans doute le fort taux de déamination de la 5-méthylcytosine en thymine dans les dinucléotides CpG ce qui entraîne un changement de C en T et un changement de G en A sur le brin complémentaire (Vignal *et al.*, 2002). Nous retrouvons bien ici ce qui a été observé en règle générale puisque, dans le gène *PRKAG3*, sur les 46 polymorphismes obtenus, 35 correspondent à des transitions. De plus, l'un d'entre eux correspond à un polymorphisme de type « indel », une variation de 7 à 9 répétitions. Ces insertions/délétions seraient dues à un glissement de la polymérase lors de la réplication (Chen *et al.*, 2005).

Dans le génome humain, il y a en moyenne un SNP toutes les 300 pb (Nelson *et al.*, 2004) dont les 2/3 sont des changements de Cytosines en Thymine. Chez le bovin, on estime, pour l'instant, la fréquence à un SNP pour 150 à 450 pb (Heaton *et al.*, 2001), ce qui est similaire à l'homme. D'autres études montrent un taux de polymorphismes plus important chez le bovin que chez l'homme (Kruglyak et Nickerson, 2001). Dans le cas du gène *PRKAG3* bovin, nous avons

trouvé 17 SNPs exoniques pour 1473 pb ce qui correspond à un SNP toutes les 87 pb, soit plus que ce qui a été montré pour le moment chez le bovin et plus que chez l'homme. Certains gènes humains sont décrits avec un nombre de SNP comparable à celui observé chez le bovin (Konfortov *et al.*, 1999 ; Heaton *et al.*, 2001). Certaines régions du génome sont considérées comme des régions hypermutables. De plus, une recherche de SNP sur un nombre important de gènes bovins a montré que le nombre de SNPs par gène est très variable d'un gène à l'autre, suggérant une pression de sélection différente entre différents gènes et/ou régions du génome.

Plusieurs allèles sont retrouvés à des fréquences relativement faibles (<1%) parmi nos échantillons. Ceci est encore plus flagrant pour les polymorphismes entraînant un changement d'acide aminé. Ce phénomène se retrouve également au niveau des gènes humains, où la quantité de SNPs présents dans les régions codantes est moins importante ; de plus, les polymorphismes exoniques ont également une fréquence plus faible (Cargill *et al.*, 1999 ; Halushka *et al.*, 1999).

Six SNPs provoquent un changement d'acide aminé. Ces changements pourraient entraîner des différences de conformation de la protéine mature. Les protéines se replient en effet en formant des hélices  $\alpha$  et des feuillets  $\beta$ . Un changement dans le repliement de la protéine peut entraîner un changement de son activité. A l'heure actuelle, le polymorphisme qui semble le plus intéressant en raison du rôle qu'il pourrait jouer du point de vue phénotypique est celui qui provoque le changement d'une Thréonine en Méthionine (T366M). Ce polymorphisme change en effet un acide aminé hydrophile en un acide aminé hydrophobe. Sachant que l'acide aminé est situé dans le domaine CBS 3 de la protéine, ce changement pourrait modifier l'activité de l'enzyme. Les domaines CBS de la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK sont des domaines fonctionnels. D'après le modèle de Cheung *et al.* (2000), l'AMP se fixerait entre les domaines CBS de la sous-unité  $\gamma$  et la région auto-inhibitrice de la sous-unité  $\alpha$ . La mutation présente dans le domaine CBS 3 pourrait empêcher cette interaction ou au contraire la favoriser, provoquant ainsi un changement d'activité. Cette mutation s'avère comparable aux mutations RN<sup>\*</sup> ou rn<sup>\*</sup> du porc qui provoquent un changement en acide aminé dans le domaine CBS 1 (Milan *et al.*, 2000 ; Ciobanu *et al.*, 2001). Les autres changements d'acides aminés en dehors des domaines CBS peuvent également affecter, à un niveau plus modeste, l'activité de l'AMPK comme l'a montré Ciobanu *et al.* (2001) sur les autres mutations exoniques du gène porcin.

Certains des polymorphismes entraînant un changement en acide aminé ne sont retrouvés que chez certaines races bovines. Ceci suggère que ces mutations sont arrivées plus récemment, et sont dues à une pression de sélection particulière qui a été exercée chez les espèces d'élevage, spécialement dans des races (Charolais et Limousins) sélectionnées pour la production de viande alors que la race Holstein a été sélectionnée pour ses aptitudes laitières.

Parmi les 17 SNPs exoniques répertoriés, 11 ne provoquent pas de changement d'acide aminé et n'ont donc aucun effet sur la séquence de la protéine produite. Cependant, ces polymorphismes provoquent un changement au niveau des codons. Bien que le code génétique soit redondant, la totalité des codons n'est pas utilisée dans un organisme (Comeron et Aguade, 1998). On trouve même un changement d'usage de codons d'un organisme à l'autre comme c'est le cas entre les bactéries et les mammifères. Des recherches ont montré une corrélation entre l'usage des codons, l'abondance des ARNt et l'expression des gènes (Duret, 2000). Dans la majorité des cas, les SNPs exoniques du gène *PRKAG3* bovin qui ne changent pas l'acide aminé entraînent néanmoins l'apparition d'un codon moins fréquent que le codon de référence. Par exemple, lorsqu'il se produit un changement du codon GUG en GUA (codant dans les deux cas pour la Valine 156), les fréquences d'utilisation des codons passent de 47% à 11%. La production de la protéine pourrait donc être ralentie chez les individus porteurs de ces polymorphismes. Il en résulterait une quantité de protéine plus faible et la possibilité qu'un phénotype soit associé à une moindre activité cellulaire de l'AMPK. Ces changements de nucléotides peuvent également jouer un rôle sur la stabilité du transcrit mature et provoquer une dégradation plus rapide des ARN messagers.

Les SNPs sont des marqueurs bi-alléliques. La signification phénotypique des SNPs provoquant un changement d'acide aminé reste pour l'instant inconnue. Dans la perspective de pouvoir analyser des tissus musculaires bovins et de pouvoir associer un phénotype avec le génotype trouvé, nous avons travaillé à la mise au point de différents tests de génotypage qui nous permettront de répertorier les différents polymorphismes présents chez un individu ; les SNPs serviront alors de marqueurs génétiques.

Les polymorphismes de type SNPs ne sont pas les seules variations génétiques observées pour le gène *PRKAG3* bovin. Nous avons également mis en évidence des transcrits alternatifs dont la traduction si elle est effective conduirait à l'insertion d'acides aminés supplémentaires au niveau de la protéine. Ces transcrits n'ont jamais été décrits jusqu'à présent chez l'homme ou d'autres espèces. Nous avons pu établir que les différents épissages observés dans le gène *PRKAG3* bovin se produisent indépendamment les uns des autres et sur les deux allèles. Ces deux épissages entraînent l'insertion de nucléotides supplémentaires sans modifier le cadre de lecture. La signification de ces insertions reste encore inconnue. En revanche, ces cas sont typiques du gène bovin. Le site d'épissage permettant l'insertion de trois nucléotides de l'intron 9 n'existe pas chez l'homme, la souris et le porc. En ce qui concerne l'épissage alternatif entraînant l'insertion de la fin de l'intron 1 dans la séquence codante, le site d'épissage supplémentaire est présent dans les 4 espèces. Pour la souris, l'absence de deux nucléotides dans cette région entraînerait, si cet épissage se produisait, un décalage du cadre de lecture. Chez l'homme et le porc, le nombre de nucléotides est identique au

bovin et cette insertion pourrait se produire. La séquence n'est pas totalement conservée entre l'homme et le bovin ce qui pourrait empêcher cette insertion. En revanche, la séquence insérée chez le bovin est complètement identique chez le porc mis à part la séquence en amont du deuxième site d'épissage. Nous avons testé dans un échantillon d'ADNc de muscle de porc la présence éventuelle de transcrits présentant cette insertion. Après séquençage (résultats non montrés), nous n'avons pas observé la présence de l'insertion chez le porc. L'épissage qui se produit dépend du site consensuel d'épissage mais également de la séquence qui borne ce site, il est donc possible que, chez le porc, la séquence ne soit pas favorable à un épissage alternatif à ce site. L'insertion de ces 6 acides aminés chez le bovin se produit dans la région N-terminale, ce qui pourrait affecter l'interaction de la sous-unité  $\gamma_3$  avec une des sous-unités  $\beta$ .

Tous ces polymorphismes et ces épissages alternatifs conduisent à une grande variabilité des transcrits. Il est supposé que des gènes qui ont une fonction vitale extrêmement importante sont particulièrement protégés des mutations. Ainsi des gènes codant pour des protéines chaperonnes comme HSP70 ou pour des cyclines comme CDC2, sont très conservés entre les espèces et sont peu polymorphes (Ramachandran et Bell, 1995 ; Johansson *et al.*, 2003). La présence de mutations sur ces gènes conduit généralement à l'apparition de phénotypes pathologiques. Ces gènes peuvent être protégés par des mécanismes particuliers inconnus ou bien, s'il existe des mutants, ceux-ci ne se propagent pas. A l'inverse, les gènes codant pour les molécules HLA sont très polymorphes (Parham et Ohta, 1996). On connaît un grand nombre de formes alléliques différentes pour l'ensemble des molécules HLA. Le polymorphisme HLA témoigne de variations individuelles dans la production des antigènes tissulaires et intervient dans la genèse des maladies auto-immunes et les défenses immunitaires. Ce polymorphisme permet la présentation d'un répertoire étendu de peptides et lui confère une meilleure capacité de réponse immunitaire contre les substances étrangères. D'autres gènes, chez le bovin, sont très polymorphes comme par exemple le gène *TLR4* codant le récepteur 4 Toll-like (White *et al.*, 2003). Ce gène possède un SNP tous les 90 pb. En ce qui concerne un gène comme *PRKAG3* qui a un rôle important dans le métabolisme énergétique, il est possible que le nombre important de variants soit le reflet d'une adaptation à des circonstances environnementales, et/ou d'une influence des pratiques de sélection qui varient d'une race à l'autre en fonction de ses différentes caractéristiques (race laitière ou à viande, viande de plus ou moins bonne qualité, animaux plus ou moins gros...). Certains des polymorphismes mis en évidence au cours de cette étude ne sont retrouvés que dans une race particulière, suggérant une influence de la sélection (Charolais vs Limousin) ou le lieu d'élevage entre les races (races françaises vs races italiennes). Certains d'entre eux peuvent avoir un rôle plus particulier dans l'activité du complexe

enzymatique AMPK, en jouant un rôle dans la régulation du complexe ou dans la liaison aux différentes sous-unités.

Une étude préliminaire montre une association entre un polymorphisme du gène et le taux de glycogène musculaire.

Les proportions des différents transcrits alternatifs ne sont pas équivalentes. En effet, des transcrits présentant une insertion de 18 nucléotides entre l'exon 1 et 2 sont présents en quantité moins importante que des transcrits sans insertion à cette position. Ceci semble également se produire pour le cas de l'insertion entre l'exon 9 et l'exon 10. Ce phénomène d'épissage alternatif a été décrit comme une voie utilisée par les génomes eucaryotes pour augmenter la diversité protéique sans augmenter le nombre de gènes (Lareau *et al.*, 2004). Ces deux épissages différents peuvent aboutir à la formation de 4 variants de transcription différents à partir du même gène. Si ces différents variants sont traduits, ce qui n'a pu être montré jusqu'à présent, ceci entraînerait la production de différentes sous-unités  $\gamma_3$  pouvant avoir des fonctions différentes.

Une analyse quantitative du taux de transcrits des différents allèles du gène *PRKAG3* a permis de mettre en évidence une corrélation entre le niveau de transcription et l'un des polymorphismes du gène. L'allèle possédant le nucléotide C en position 2339 a un niveau d'expression plus important que celui des autres allèles. Ce polymorphisme est situé dans l'exon 4. Ceci suggère que les individus possédant cet allèle ont une quantité de protéines  $\gamma_3$  plus importante, ce qui pourrait entraîner une activité différente du complexe AMPK. La quantification des différentes formes de transcrits a été réalisée sur un nombre assez faible d'animaux. Bien que l'allèle C en position 2339 semble être lié à une augmentation du taux d'expression du gène, on ne peut toutefois pas exclure la possibilité de variations individuelles. De plus, il est nécessaire de confirmer ces résultats avec des individus homozygotes pour l'allèle C, afin de vérifier si ceux-ci présentent également une augmentation du niveau d'expression du gène *PRKAG3*. Cet allèle particulier ne se retrouve pas associé avec un polymorphisme particulier dans la région promotrice de gène. Un polymorphisme dans une région plus en amont pourrait être à l'origine de ces variations dans le niveau d'expression des différents transcrits.

Une corrélation entre le génotype et la teneur en glycogène musculaire a été mise en évidence grâce à une étude réalisée sur 100 veaux de race Holstein. On retrouve une association significative entre ce taux de glycogène et le polymorphisme situé en position 2343. Ce polymorphisme ne provoque pas de changement en acide aminé donc il ne semble pas être responsable de l'accumulation ou non du glycogène par un changement d'activité de l'AMPK. En



revanche, il pourrait jouer un rôle de marqueur, car même s'il ne s'agit pas du polymorphisme causal, il semble associé à cette accumulation. Aucun des différents haplotypes ne présente d'association avec le taux de glycogène, ceci est dû au fait du nombre important d'haplotypes par rapport au nombre d'animaux utilisés, et de plus, seulement trois haplotypes sont retrouvés dans des proportions correctes. Néanmoins, ce polymorphisme qui semble avoir une association avec le taux de glycogène musculaire n'est retrouvé que dans deux haplotypes.

Les individus hétérozygotes ont une quantité de glycogène plus importante que les deux groupes d'homozygotes. L'effet, s'il est trop important, peut subir une régulation par feed-back négatif et réduire le taux d'accumulation. Une autre hypothèse, peut-être la plus plausible, est l'existence d'une grande variabilité entre les trois groupes. Le modèle étudié comporte un fort déséquilibre dans la répartition des allèles. On retrouve seulement 4 animaux homozygotes pour l'allèle A, 19 animaux hétérozygotes et 77 animaux homozygotes pour l'allèle G. L'étude réalisée n'est qu'une étude préliminaire et les différents animaux ont été choisis au hasard. Afin de confirmer ces résultats, il est nécessaire de refaire cette étude avec un nombre plus conséquent d'individus, mais surtout une répartition plus homogène de la distribution des allèles.

La sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK n'a pas pu être produite *in vitro* en système procaryote ou eucaryote.

Nous ne disposons pas d'anticorps spécifique de la protéine bovine mais nous avons pu vérifier que l'anticorps dirigé contre la protéine murine réagit en Western blot avec celle présente chez le bovin. Nous observons de plus une répartition de la protéine qui semble être différente de celle observée chez d'autres espèces (homme ou porc). La sous-unité  $\gamma_3$  se retrouve dans les muscles (RA, ST et diaphragme) mais également dans le cœur. L'ARN messager du gène *PRKAG3* code un polypeptide  $\gamma_3$  de 490 acides aminés avec une masse moléculaire calculée de 55 kDa. Les sous-unités  $\gamma_1$  et  $\gamma_2$  ont des masses moléculaires différentes : 63 kDa pour  $\gamma_2$  et 37 kDa pour  $\gamma_1$ , nous pouvons donc penser que la protéine révélée par Western Blot est bien la sous-unité  $\gamma_3$  et non une réaction croisée avec l'une des autres sous-unités  $\gamma$ . Bien que la protéine soit présente dans le cœur ceci ne veut pas dire qu'elle soit active. La sous-unité  $\gamma_3$  peut être présente sans être liée aux autres sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .

Le polymorphisme particulièrement élevé du gène *PRKAG3* bovin laisse penser que, à l'instar de ce qui a déjà été démontré chez le porc, l'enzyme AMPK pourrait se présenter sous différentes formes fonctionnellement variables. C'est dans ce but que nous avons cherché à cloner et à exprimer les différentes variations génétiques observées.

La production de la protéine grâce au système *in-vitro* a permis d'obtenir une protéine presque pure qui correspond à la taille révélée en Western blot sur les différents tissus bovins. Cependant, les quantités de protéines obtenues *in-vitro* étaient faibles et le milieu réactionnel contenait également d'autres protéines. Après purification, la protéine PRKAG3 était quasiment pure, mais les quantités obtenues étaient encore plus faibles, ce qui s'est révélé insuffisant pour réaliser une immunisation dans le but d'obtenir un anticorps spécifique. La production en plus grosse quantité de cette protéine par ce système de production a été abandonnée pour des raisons de coût. Le moyen le plus abordable était la production de la protéine bovine par un système de production hétérologue. Neumann *et al.* (2003) avait produit le complexe AMPK  $\alpha_1\beta_1\gamma_1$  de rat par expression bactérienne. Cela semblait donc le meilleur moyen de produire cette protéine et le complexe enzymatique complet de l'AMPK. Il s'est révélé impossible de produire la sous-unité  $\gamma_3$  chez la bactérie *E. coli*, et par conséquent de produire le complexe AMPK entier. Différents échanges avec cette équipe nous ont appris qu'ils leurs avaient également été impossible de produire les formes  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$  de l'AMPK. Il semblerait que le domaine N-terminal de la protéine  $\gamma_3$  soit un problème pour l'expression de cette sous-unité. La sous-unité  $\gamma$  a été décrite comme étant N-acétylée et ne comportant aucune autre modification post-traductionnelle (Kemp *et al.*, 1999 ; Cheung *et al.*, 2000). Bien qu'étant décrite chez beaucoup d'organismes et très étudiée, il se peut que la sous-unité  $\gamma_3$ , notamment, comporte d'autres modifications post-traductionnelles qui sont impossibles à effectuer chez la bactérie. Cette protéine n'étant pas productible par un système procaryote, nous nous sommes tournés vers un système d'expression eucaryote. Plusieurs types cellulaires ont déjà été utilisés pour produire la protéine  $\gamma_3$  comme les cellules COS7 (Barnes *et al.*, 2004) ou encore la lignée myoblastique L6 (Yu *et al.*, 2003). Nous avons choisi d'utiliser les lignées rénales COS7 et HEK293 afin d'éviter un problème de présence de protéine endogène. La lignée COS7 ne semblait pas poser de difficultés particulières puisque Barnes *et al.* (2004) avaient utilisé ce type cellulaire pour exprimer la protéine murine. Malgré différentes mises au point et l'utilisation de différents vecteurs d'expression, nous n'avons pu observer aucune expression dans ces deux types cellulaires. On peut suggérer plusieurs explications à ce phénomène. Une des possibilités est de considérer que, comme cette sous-unité n'est pas spécifique à ce type de tissu, les transcrits ou les protéines peuvent être dégradés au fur et à mesure de leur synthèse. Cependant ce type de problème ne serait pas spécifique au bovin, et il en serait de même pour toutes les sous-unités  $\gamma_3$ , or la protéine  $\gamma_3$  murine a pu être exprimée dans les cellules COS7 (Barnes *et al.*, 2004). Il est possible aussi que la quantité massive de gènes introduits dans les cellules par cette technique entraîne un phénomène de titration de facteurs de transcription indispensables et présents en quantité limitée. Enfin, la régulation de l'expression d'un transgène dans un plasmide non intégré au

génomique peut ne pas s'effectuer de façon tout à fait correcte. L'une des dernières hypothèses que nous pouvons faire est un problème de faible expression protéique qui ne permet pas la détection de la protéine en Western blot, ceci d'autant plus que nous ne disposons pas d'un anticorps parfaitement spécifique.

La réalisation des tests d'activité, principalement prévus pour être réalisés sur les protéines produites, a été effectuée sur des extraits protéiques totaux à partir de muscles squelettiques. L'une des raisons pour lesquelles nous n'avons pu observer d'activité du complexe AMPK dans ces tissus pourrait être la présence d'un composé inhibiteur dans le milieu réactionnel. Soit celui-ci a pu être introduit lors de l'extraction protéique à partir de tissu, soit celui-ci est déjà présent dans les tissus comme des phosphatases qui entraîneraient une inactivité du complexe enzymatique. La meilleure solution pour cette étude d'activité aurait été de réaliser une immuno-précipitation du complexe ce qui nous a été impossible compte tenu de la mauvaise spécificité de notre anticorps vis-à-vis de la sous-unité  $\gamma_3$  bovine.

Les différentes sous-unités bovines de l'AMPK ont été caractérisées et quantifiées.

Les autres gènes codant les différentes isoformes des sous-unités de l'AMPK n'étaient pas connus chez le bovin. Le séquençage du génome bovin a permis d'identifier leurs séquences sauf pour *PRKAB2* et *PRKAG2*. Nous avons établi les séquences codantes des différents gènes et celles-ci présentent de fortes homologies avec les séquences des autres espèces. Quelques polymorphismes ont été identifiés dans ces gènes codant les autres sous-unités, mais ce taux de polymorphisme est loin d'atteindre celui observé pour le gène *PRKAG3*. La quantification des transcrits des gènes des différentes sous-unités a été réalisée sur plusieurs tissus bovins. On remarque notamment que le gène *PRKAG3* est exprimé de manière plus importante dans les muscles squelettiques, ce qui avait déjà été montré dans les autres espèces (Milan *et al.*, 2000). Les autres sous-unités montrent, en revanche, une expression plus ubiquitaire et un niveau d'expression similaire suivant les tissus. On constate cependant une transcription du gène *PRKAA1* beaucoup plus faible dans le colon et la glande mammaire. Ceci laisse supposer que dans ces tissus, l'activité de l'AMPK est due principalement à la sous-unité  $\alpha_2$ .

L'étude du gène *PPARG* bovin a révélé la présence d'épissages intergéniques chez le bovin.

L'étude du gène *PPARG* bovin nous a permis de mettre en évidence un phénomène d'épissage entre deux gènes voisins (Roux *et al.*, 2006). Ces deux gènes sont situés à environ 50 kb de distance dans la même orientation 5' à 3' sur le chromosome 22q24 de bovin. Nous avons identifié deux types de transcriptions chimériques, différant par la présence/absence d'un exon

intermédiaire correspondant à une séquence LINE en amont du gène *TSEN2*. Le mécanisme affectant ces deux gènes n'a jamais été mis en évidence que ce soit chez l'humain ou chez la souris. Cette situation se produit dans les ARN messagers intergeniques, cependant, les raisons pour lesquelles ceci se produit sont toujours inconnues. Bien que ce genre d'événement semble être très rare, plusieurs exemples ont été rapportés, dans lesquels les gènes voisins, qui sont dans la même orientation, étaient affectés. Pour les multiples cas décrits jusqu'ici, la distance physique entre les gènes impliqués semble n'avoir aucune influence (Finta et Zaphiropoulos, 2000 ; Millar *et al.*, 2000 ; Communi *et al.*, 2001). La raison pour laquelle ce mécanisme se produit entre les gènes *PPARG* et *TSEN2* chez le bovin reste inconnue.

L'existence de la protéine chimère *in vivo* n'a pu être démontrée. Ceci peut être dû au fait que l'expression de transcrits chimériques était largement inférieure à celle des transcrits du gène *PPARG*, ainsi la protéine produite peut paraître indétectable par immunodétection. Il est également possible que la traduction de ces transcrits chimériques ne soit pas possible *in vivo*. En effet, bien que des transcrits chimères aient été rapportés pour un certain nombre de gènes, l'existence d'une protéine de fusion a été mise en évidence seulement dans le cas de MASK-4E-BP3 (Poulin *et al.*, 2003). Il est difficile d'évaluer la signification fonctionnelle d'une protéine chimérique résultant de la traduction de transcrits chimères entre les gènes *PPARG* et *TSEN2* puisque ces deux gènes ont des fonctions spécifiques qui n'ont à priori rien en commun. Cette protéine de fusion a été produite par expression transitoire dans des cellules COS7. La protéine obtenue, détectable par un anticorps anti-PPAR $\gamma$ , est d'une taille correspondant à la taille théorique de la protéine chimérique. Cette protéine se compose du domaine liant l'ADN et d'une partie du domaine liant le ligand de PPAR $\gamma_1$ , ainsi que du domaine catalytique C-terminal de l'endonucléase de Sen2. La protéine Sen2 liée à Sen34, Sen15 et Sen54, forme le complexe d'endonucléase des ARNt. Une étude plus complète sur cette protéine de fusion permettrait peut-être de comprendre son rôle.



# *Conclusion — Perspectives*



Les résultats obtenus apportent les bases de nouvelles connaissances sur le gène *PRKAG3* bovin, sa structure, son expression et son association avec le taux de glycogène musculaire. L'étude du gène chez le porc a montré une association avec un phénotype particulier sur la viande. Or, il a déjà été montré qu'un gène responsable d'un effet phénotypique dans une espèce peut être responsable d'un effet similaire dans une autre espèce. C'est le cas du gène de la myostatine dont plusieurs mutations sont responsables d'une hypertrophie musculaire dans certaines races bovines (Blanc-Bleu Belge, Charolais et Piemontaise) (Grobet *et al.*, 1997). Ce même caractère d'hyper-musculature, lié à une mutation dans le gène de la myostatine, est également retrouvé chez le mouton Texel (Clop *et al.*, 2006). Ceci montre que des caractères quantitatifs touchant plusieurs espèces ont pour origine des causes génétiques semblables. Le gène codant la sous-unité  $\gamma_3$  de l'AMPK chez le bovin se comporte comme une entité modulable engendrant plusieurs combinaisons de transcrits, et donc de protéines, tant par la présence des polymorphismes que par la présence de transcrits alternatifs. Chacune des isoformes produites pourrait avoir un rôle particulier dans la régulation de l'activité de l'AMPK, favorisant ou inhibant son activation. On peut aisément imaginer que la présence de certaines séquences peptidiques, qu'il s'agisse d'un fragment supplémentaire ou d'un changement en acide aminé, agirait sur l'affinité de la sous-unité pour l'AMP ou sur son association avec la sous-unité  $\beta$ . Certains polymorphismes du gène *PRKAG3* se retrouvent associés avec un effet phénotypique particulier. Deux d'entre eux présentent une association particulière avec le taux de glycogène intra-musculaire. Un autre est associé avec une augmentation du taux d'expression du gène. Ces différents variants peuvent alors jouer un rôle dans la régulation de l'activité enzymatique. Des études supplémentaires pourront être mises en œuvre afin d'affiner ces résultats. Une étude plus spécifique d'association avec des animaux ciblés pour leurs génotypes pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus dans l'analyse préliminaire réalisée sur les veaux de race Holstein. Afin de vérifier l'augmentation du taux d'expression associé avec un allèle du polymorphisme en position 2339, il serait intéressant de confirmer ce résultat par une étude de quantification d'expression allélique. Dans les deux cas l'idéal serait de produire les protéines présentant ces deux variations et d'observer les éventuelles conséquences sur l'activité du complexe enzymatique. A la vue des données obtenues, nous pouvons nous interroger sur la poursuite du travail : doit-on approfondir l'étude d'association du polymorphisme de *PRKAG3* avec le taux de glycogène sur un nombre plus conséquent d'individus, ou doit-on d'abord vérifier le niveau de variation d'expression allélique à cette position, ainsi qu'aux positions voisines ? Si l'on réalise cette étude d'association sur un nombre plus important d'individus, ceci implique d'effectuer des mesures du taux de glycogène dans le cadre d'un projet à



grande échelle. Des études supplémentaires pourront être mises en œuvre afin d'affiner ces résultats.

Le gène *PRKAG3* présente un polymorphisme élevé chez le bovin. L'étude d'haplotype montre une distribution variable selon les races étudiées. Trois haplotypes majeurs se détachent de cette étude, néanmoins la distribution des proportions haplotypiques est différente selon les races. Certains haplotypes en revanche ne se retrouvent que dans une race précise, c'est le cas de l'haplotype H2 par exemple, avec une fréquence relativement importante. Ce polymorphisme entraînant un changement en acide aminé, et non retrouvé dans la race Holstein, il serait intéressant de mettre en relation ce polymorphisme avec des mesures phénotypiques comme réalisé dans le cas de l'étude sur la race Holstein. D'autres haplotypes sont en revanche plus spécifiques de l'origine des animaux. L'haplotype H32 est retrouvé uniquement dans les races d'origine italienne. En proportion plus faible, l'haplotype H16 n'est présent que dans les races françaises. On pourrait en conclure à une adaptation géographique des races.

L'AMPK a un effet stimulateur sur l'oxydation des acides gras dans le muscle. Les récepteurs  $PPAR\gamma$  ont un rôle majeur dans la mise en place et le métabolisme du tissu adipeux. Il semblait de ce fait important de s'intéresser également au gène *PPARG* bovin. Cette étude du gène *PPARG* bovin a permis de mettre en évidence un phénomène d'épissage inter-génique. L'épissage entre gènes, résultant de la combinaison de séquences d'ARNm entre gènes distincts, est un nouveau mécanisme identifié contribuant à la diversité protéique. Quelques cas ont été décrits, la plus part d'entre eux intervenant entre gènes voisins, ceci suggérant une cotranscription potentielle due à une dérive de la terminaison de la transcription. L'expression d'une protéine chimère recombinante et sa caractérisation pourrait permettre de mettre en évidence son activité éventuelle. D'autre part, il est nécessaire de disposer d'un anticorps spécifique de cette protéine afin d'identifier son existence *in vivo*.

Il a été suggéré que l'épissage intergénique pourrait être un mécanisme d'évolution permettant à un organisme d'acquérir des protéines avec de nouvelles fonctions (Communi *et al.*, 2001). Le fait de combiner différents domaines protéiques peut être un moyen d'augmenter la complexité et la diversité des protéines, d'une façon similaire à ce qui se passe pour les immunoglobulines. Un cas de protéine chimère, protéine TWE-PRIL, ayant une activité enzymatique a précédemment été reporté. Les deux gènes *TWEAK* et *APRIL* codent respectivement deux membres distincts de la famille des ligands du TNF (Tumor Necrosis Factor) (Pradet-Balade *et al.*, 2002 ; Kolfshoten *et al.*, 2003). *TWEAK* est une protéine membranaire alors qu'*APRIL* est une protéine sécrétée. Il existe également un transcrit chimère combinant des exons de ces deux

gènes et codant une protéine hybride TWE-PRIL ancrée dans la membrane comme TWEAK et présentant le domaine de liaison de APRIL. Il s'agit d'un cas unique où la protéine hybride combine les fonctions des deux protéines. Les deux gènes sont situés à une distance d'un kilobase l'un de l'autre sur le génome et on peut effectivement se demander si, dans ce cas, il ne s'agit pas plutôt de trois transcrits alternatifs d'un seul et même gène qui posséderait plusieurs promoteurs. Cependant la distance physique entre deux gènes n'est pas non plus un argument puisqu'il existe des gènes étendus sur plusieurs centaines de kb avec des introns de plusieurs dizaines de kb. Peut être que la définition des limites d'un gène n'est pas aussi simple que ce que l'on a toujours cru jusqu'à aujourd'hui.



*Nouveau Chapitre de Thèse*

*Valorisation des compétences*



La rédaction du « nouveau chapitre de la thèse » est proposée par l'école doctorale Sciences-technologie-Santé en collaboration avec l'association Bernard Grégory. Il n'a pas un caractère académique, mais il permet de faire un bilan du déroulement de la thèse en tant que projet. Cette analyse, qui se doit d'être compréhensible par des non-spécialistes du sujet de thèse, pourrait être exploitable dans la perspective d'une valorisation professionnelle de la thèse.

L'objectif de ce « nouveau chapitre de la thèse, valorisation des compétences », est d'établir un inventaire et une mise en valeur des compétences, autres que scientifiques et techniques, qui ont été nécessaires tout au long de la thèse.

### 1. Cadre général, enjeux et présentation.

Le gène *PRKAG3* code pour l'isoforme  $\gamma_3$  de l'enzyme AMPK (protéine kinase AMP dépendante). Cette enzyme joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique. La protéine kinase AMP<sup>1</sup> dépendante, est un complexe enzymatique composé d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$ , chacune de ces sous-unités étant présentes sous deux ou trois formes différentes. Ce complexe enzymatique est activé en particulier par une augmentation du taux AMP/ATP. Lorsqu'il est activé, il stimule la synthèse d'ATP<sup>2</sup> et diminue son utilisation par des fonctions non essentielles.

Des mutations présentes sur la sous-unité  $\gamma$  influent sur l'activité enzymatique du complexe. L'une d'entre elles va notamment donner une enzyme constitutivement active. Cette mutation dans un des domaines essentiels de la protéine  $\gamma_2$  entraîne chez l'homme le syndrome de Wolf-Parkinson-White et est associé à une cardiomyopathie hypertrophique et un taux relativement élevé de mort subite. Le même type de mutation a été identifié sur la protéine  $\gamma_3$  chez le porc où elle provoque une augmentation du taux de glycogène musculaire induisant une diminution des rendements lors de l'élaboration de jambons cuits et salés.

Actuellement, aucune évaluation et donc aucune sélection n'est réalisée sur la qualité de la viande bovine. De ce fait, il n'est pas possible de prévoir l'évolution de cette qualité suite à une sélection pratiquée sur la croissance musculaire (seul critère de sélection existant à l'heure actuelle). La qualité d'une viande est déterminée par le métabolisme musculaire puisque celui-ci gère les caractéristiques biochimiques du muscle. La concentration en glycogène musculaire au moment de l'abattage est un des facteurs les plus importants dans la qualité de la viande bovine, des taux insuffisants pouvant s'avérer responsables d'un pH trop élevé et d'une viande impropre à la

---

<sup>1</sup> AMP : Adénosine Mono-Phosphate

<sup>2</sup> ATP : Adénosine Tri-Phosphate

consommation. Ce taux de glycogène dans les muscles bovins est très dépendant du stress au moment de l'abatage, du régime alimentaire, ... Ainsi nous avons dirigé nos recherches sur le gène *PRKAG3* et réalisé une étude moléculaire de ce gène (structure, recherche de polymorphisme, expression des transcrits). Le répertoire hétérogène de transcrits bovins est susceptible de donner une diversité de variants protéiques. Une étude d'association entre les variations génétiques et certaines propriétés physico-chimiques de la viande a ensuite été réalisée.

L'AMPK est un sujet très étudié au niveau international, plusieurs équipes travaillent sur cette protéine qui est présente dans toutes les espèces, aussi bien animales, végétales que bactériennes. Notre groupe n'est pas le seul à s'intéresser à l'espèce bovine, ce sujet est également étudié par une équipe américaine ainsi qu'une équipe coréenne, qui réalisent un travail similaire au notre. Ceci est dû au fait qu'au début de mon travail sur ce sujet beaucoup de choses étaient connues sur cette protéine chez l'homme, la souris, le porc mais rien n'était disponible dans les autres espèces, en particulier le bovin.

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'UMR 1061 INRA/Université de Limoges sur le site de la Faculté des Sciences et Techniques. Cette Unité de Génétique Moléculaire Animale est constituée de trois équipes : l'équipe « Glycogénome », l'équipe « Génomique et traçabilité » et l'équipe « Génomique et muscle ». Mon travail s'inscrit dans le cadre de cette dernière équipe. Plusieurs critères ont motivé mon choix d'effectuer mon DEA puis ma thèse au sein de ce laboratoire.

Tout d'abord, le fait de travailler sur la qualité des viandes bovines, qui est un critère important pour le consommateur, confère au sujet un but appliqué qui se révèle être extrêmement valorisant. Outre l'intérêt potentiel de cette étude dans le domaine de l'industrie de la viande bovine, l'existence d'autres mutations naturelles présentes chez le bovin serait une source importante d'information sur cette enzyme. De plus, le laboratoire m'offrait la possibilité d'utiliser un nombre de techniques variées ce qui s'est avéré très enrichissant en terme d'apprentissage. Enfin, la thèse que j'ai réalisée s'inscrivait dans la continuité de mon DEA, ce qui a permis une évolution logique et rapide de mon travail.

## 2. Déroulement, gestion de projet et moyens mis en œuvre.

Mon groupe de projet a été constitué de ma directrice de thèse Valérie Amarger, Chargée de recherche à l'INRA, ainsi que de mon co-directeur de thèse Hubert Levéziel, Directeur de recherche à l'INRA. Ce groupe se réunissait régulièrement pour organiser, réorienter le projet mais également

lorsque j'avais besoin de leurs conseils à tout point de vue. Même si je n'ai eu que deux interlocuteurs principaux, ils furent très disponibles.

De plus, j'ai pu profiter de l'aide technique plus ponctuelle de deux ingénieurs ainsi que de celle des autres membres du laboratoire. J'ai également bénéficié de plusieurs collaborations permettant de faire avancer mon projet : l'équipe du Dr Ahmed Ouali de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix, les abattoirs Spanghero (Castelnaudary) et l'unité de sélection MIDATEST (Toulouse). Afin d'obtenir ces collaborations, il a fallu convaincre les différents participants lors de réunions. Les différents partenaires de notre projet, n'étant pas tous du même domaine, l'exercice le plus difficile a été de présenter nos résultats et nos hypothèses de manière compréhensibles à des partenaires non-scientifiques. Cette expérience m'a permis d'appréhender les avantages et les contraintes d'un travail en équipe pluridisciplinaire (enrichissement mutuel lorsque nous avons su dépasser les premières difficultés de compréhension). J'ai également du faire face à l'annulation, pour des raisons politiques extérieures à notre équipe, d'une importante collaboration qui était prévue et qui m'aurait permis, grâce à l'apport de compétences extérieures complémentaires, d'aborder un autre aspect de mon sujet de thèse. Ceci m'a fait perdre du temps et m'a obligé à réorienter mon projet.

Grâce à une collaboration du laboratoire avec l'Université de Pise, j'ai également pu travailler avec une doctorante italienne. Nos projets de recherche étant assez liés, nous avons réalisé une partie du travail en commun.

Plusieurs fois, j'ai eu l'occasion de présenter mon travail à tout le laboratoire ainsi qu'au Séminaire des Thésards du Département de Génétique Animale de l'INRA ce qui m'a permis d'acquérir plus d'aisance lors des communications orales.

Le matériel utilisé a été principalement financé par l'INRA et l'Université de Limoges. Je disposais d'ailleurs de tous les moyens techniques disponibles au laboratoire pour mener à bien mon projet. En effet, le laboratoire possède de nombreux équipements qui m'ont été très utiles, notamment un appareil de PCR quantitative qui m'a permis de quantifier les différents transcrits des gènes étudiés mais également de faire le génotypage des différents polymorphismes sur les animaux dont je disposais. De plus, j'ai pu apprendre les techniques de culture cellulaire sur des cellules animales. Ces techniques sont parfaitement maîtrisées au niveau du laboratoire. Aucun achat ne m'a d'ailleurs été refusé à partir du moment où il était justifié. Le tableau ci-dessous récapitule les dépenses effectuées lors de ma thèse.



Catégorie		Coût (€)
Personnel	Doctorant	67089 50% INRA 50% Région
	Directeur	19066
	Co-directeur	12062
	Ingénieurs	7467
	Technicien	8700
	Autres	22473
	Matériel	Consommables
Equipement		1500
Infrastructure	Amortissement locaux et équipement	25000
	Frais d'entretien	5000
Déplacements/Congrès		2800
TOTAL		230957

Les ressources pour le projet sont :

- des subventions de la région et de l'Etat,
- des fonds de l'Université.

### 3. Compétences développées dans le cadre du projet.

Cette thèse constitue pour moi une expérience professionnelle majeure. Elle m'a permis d'acquérir des compétences et connaissances à la fois scientifiques, techniques et méthodologiques. Tout d'abord dans le domaine de la biologie cellulaire, j'ai appris à cultiver des lignées cellulaires animales de type Cos ou HEK 293. Dans le domaine de la biologie moléculaire, en plus de l'utilisation des techniques classiques (PCR, séquençage, clonage...), j'ai pu me former à l'utilisation de techniques de PCR quantitative (en utilisant les technologies TaqMan ou SYBR green) ainsi qu'à l'utilisation de techniques de génotypage des polymorphismes (analyse de fragment sur séquenceur capillaire, génotypage de SNPs<sup>3</sup> par chimie TaqMan, Amplifluor ou

<sup>3</sup> SNP : Single Nucleotide Polymorphism

polarisation de fluorescence). Le dernier point est l'utilisation de techniques biochimiques comme les tests d'activité réalisés sur protéines.

Cette période m'a également permis d'acquérir des compétences utiles dans tout travail de recherche : autonomie, analyse d'un problème, évaluation des difficultés, proposition de méthodes pour les résoudre, mise en place d'un planning.

Compétences méthodologiques en conduite de projet :

- gestion du temps : évaluation de la durée des expérimentations avec une évaluation des difficultés rencontrées et des différentes solutions à apporter
- gestion de tâches menées en parallèle : définition des étapes, analyse et contrôle de leur réalisation
- adaptation : mise en place d'une stratégie expérimentale en fonction des moyens techniques disponibles au niveau du laboratoire ainsi qu'une éventuelle recherche de collaboration
- maîtrise du risque : réalisation d'un second projet en parallèle du sujet principal de thèse dans le cas où rien de concluant sur le sujet n'aurait été mis en évidence
- documentation et veille scientifique et technologique (bibliographie : recherche d'informations, résumé)
- mise en valeur des résultats par le biais de communications et articles scientifiques, synthèse des différents résultats, synthèse et mise en forme du travail accompli
- réalisation du projet de recherche

L'acquisition de toutes ces connaissances fût l'objet d'un travail personnel rigoureux. Les difficultés techniques rencontrées m'ont amené à persévérer, à réorienter mon travail et à ne jamais me décourager.

Mes communications orales présentées lors de congrès 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.

Mon envie de participer à un congrès scientifique, dans le but de présenter mes résultats à la communauté scientifique spécialisée dans le domaine de la génétique animale et de rencontrer d'autres personnes afin de trouver un post-doctorat par la suite, 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. En effet, après avoir convaincu mon directeur de laboratoire que cette expérience était nécessaire pour ma

thèse et mon projet professionnel, il a fallu trouver un financement pour le congrès et organiser le voyage.

Cette capacité de persuasion a été indispensable également pour négocier la faisabilité d'une manipulation ou encore l'achat d'un produit coûteux mais indispensable.

Notre collaboration avec l'Université de Pise m'a permis d'« encadrer » une doctorante italienne (Elena Ciani) lors de sa venue au sein du laboratoire et de lui apprendre différentes techniques. Elle s'est révélée très compétente ce qui m'a amené, très rapidement, à lui déléguer des travaux. Cette expérience était très enrichissante par l'apport des résultats acquis mais surtout par l'apprentissage de l'encadrement.

Cette thèse a été l'occasion pour moi de pouvoir effectuer quelques enseignements grâce à des vacances. Tout d'abord des vacances dans le cadre de la formation en Master II professionnel Génétique, Physiologie, Biotechnologie. J'ai pu grâce à ces interventions faire un exposé public, apprendre à mettre en forme de manières pédagogiques différentes notions afin de les restituer de façon compréhensible, faire passer un savoir et le confronter à un auditoire. J'ai également pu assurer des interventions, dans le cadre d'une formation de l'Institut de l'Élevage, face à un auditoire de professionnels non familiers des techniques de biologie moléculaire. Cela m'a montré une voie différente : l'enseignement, et m'a permis d'envisager le métier d'enseignant-chercheur comme une piste potentielle d'avenir.

#### 4. Résultats, impact de la thèse.

Le bilan de ces trois années passées, est à la fois scientifique et personnel. D'une façon générale, il m'a 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 souhaiterais le mettre à profit en intégrant une nouvelle équipe.

La conduite de mon projet de thèse m'a appris une certaine organisation du travail que je souhaiterais comparer à celle d'un autre laboratoire afin d'échanger et d'apprendre de nouvelles techniques. 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, me semble très intéressant à découvrir pour ma future intégration professionnelle. Ayant réalisé toutes mes études à Limoges, je pense qu'il est important que j'acquière une autre expérience dans un environnement différent afin de parfaire mes compétences et d'en développer de nouvelles.

Je ne sais pas encore si je souhaite réaliser cette expérience dans le secteur privé ou public mais je sais avec certitude que je souhaite continuer dans le domaine de la recherche. Mon objectif premier étant de faire un travail qui me passionne.



# *Annexes*



## Amorces employées pour l'amplification PCR, le séquençage et le clonage.

PPARG-F1: GCCCAGGTTTGTCTGAACG  
 PPARG-F2: ACATGAACCTCTTAATGATGGGAG  
 PPARG-F21: GAACTTATGCTGTGCTATTTG  
 PPARG-F3: CTGGTCTCTGTGAGTTATTCTCC  
 PPARG-F4: TCCCCTTGCTTAGTTGTTCCAGG  
 PPARG-F5: AGAGAATCTGGATCGCTGTGTCA  
 PPARG-F6: TTGAAAAGAGCCACAACATACAAC  
 PPARG-F7: CATTTGGAAACAGACGACAGAC  
 PPARG-F8: CCTGAAGGAACAGTCACTTGGG  
 PPARG-F9: CGATGAGCCCCAACTCCGAG  
 PPARG-F10: GGGCACCAGACTATCCTAGAAG  
 PPARG-F11: CTTTTATAATCCCAAGGCAC  
 PPARG-F12: CTGCTGGGTGTCAGTAATTCC  
 PPARG-F13: GTCTTGTCCAACACCACAGTTC  
 PPARG-F14: TTTTGGCTGTGTGGGGTC  
 PPARG-F15: CCAGTGCCGAGGACCACAAC  
 PPARG-F16: GGAAGAGGCGTCGCCTTTTCCG  
 PPARG-F17: GTGCCGCGACAGAGTAAGG  
 PPARG-F18: GGTAACGTTGCGCGCGTGCC  
 PPARG-F19: CGCTGCTTGACGGCAGCTGG  
 PPARG-F20: TGCTGTATCGAAAAGGCCCTC  
 PPARG-R1: CCTCAAAAATAATAGTGCAATTGG  
 PPARG-R2: GTCGCTGTCTAATTCAGTG  
 PPARG-R3: CTTGTGAGTCTTTCAGACAC  
 PPARG-R4: GCCCCTCACGATCACATGG  
 PPARG-R5: ACCAGGCCTGGATGGACTGG  
 PPARG-R6: GATTTGTCTGTCTGTCTGTTCC  
 PPARG-R7: AAGTCAAGTTCACGGAGCTG  
 PPARG-R8: GATTTTATCTTCTCCCATCATAG  
 PPARG-R9: ATTTGTCTGTCTCCATCATAG  
 PPARG-R10: CCTCTCCCGTGAAGAGACCC  
 PPARG-R11: CGCATAGACCAGGAAGAAGGC  
 PPARG-R12: CTTCTGTAACACTGTGGCTGC  
 PPARG-R13: CTTTCCATTTAGCAACCAGCTTAG  
 PPARG-R14: CTGAGAGCAGGAAGCATCAGG  
 PPARG-R15: GAAGACCCGGAAGGAGCTA  
 PPARG-R16: CAAGATTAAGAAAATTGACCTGGG  
 PPARG-R17: CGTTCTGAACCACAGTTTCCCT  
 PPARG-R18: CACCATAGTGTAGGTACACAATAC  
 PPARG-R19: TGCAGCTGCAACTAATGAGCA  
 PPARG-R20: CCCTGTGGGACCTCTTCG  
 PPARG-R21: CTTGGAGACTGACTGACA  
 ChimFr1-F1: TCTCTACATATGGTTGACACAGAGATGC  
 ChimFr1-R1: TGAGACATCCCCACAGCAAGG  
 ChimFr2-F1: CTTCCGGAGGACAATCAGATTG  
 ChimFr2-R1: TCCCGGCCTTGTCTTCGC  
 ChimFr3-F1: AGCGTAGCGTGGAGTGGGC  
 ChimFr3-R1: GTTAAGCCTAGGTTAAAGTTGCTCCTGG  
 PRKAA1-F1: GTCAAAATCGGCCAAAATGATATC  
 PRKAA1-F2: ATGAAATTACTGAAGCCAAATCAG  
 PRKAA1-F3: GAGATGTGCGCAATCTAATT  
 PRKAA1-F4: TGCACAGGCATATGGTGGTC  
 PRKAA1-R1: CCATCAATACTTCGGAAATCCAG  
 PRKAA1-R2: GATTATACATGGAAGCATTTGGC  
 PRKAA1-R3: TAGCCAAAATAATCAAGTGAGCC  
 PRKAA1-R4: GGGGTATAAAAGATCCCATCACA  
 PRKAA2-F1: GATACCAGGTGATCAGCACTCC  
 PRKAA2-F2: GAGATGGAAGCTCGGCGG  
 PRKAA2-F3: AGCAGACAGCCCTAAAGCACG  
 PRKAA2-F4: CTGTCCATGGAATTCTCCAG  
 PRKAA2-F5: AGGCTTACACAGACCACGGTCCAGTTT  
 PRKAA2-F6: TCAGGGTACCAATAAATGGAAC  
 PRKAA2-F7: TGGAGAGCATCAATTGACAGG  
 PRKAA2-F8: GCCGAACATGGCTGAGAAGC  
 PRKAA2-R1: TCAGCTATCTTGGCATTCTCTG  
 PRKAA2-R2: CTGAGATGACTTCAGGTGCTGC  
 PRKAA2-R3: CAACCAGGTACAGCTGTAAGCTC  
 PRKAA2-R4: CTCAGCCAAGAATGCTATTC  
 PRKAA2-R5: CTCTTCACTTTGCCGAAGGTGCCGACGCC  
 PRKAA2-R6: TGATTTTACAGTGCAATAACAG  
 PRKAA2-R7: TTTGATAATATGAGGATGACGAAAGA  
 PRKAA2-R8: TCTTTGTGGTTTGTCTATTCTTACT  
 PRKAA2-Ase1: CTATGTATTAATATGGCTGAGAAGCAGAAGC  
 PRKAA2-Avr2: TAATATTACCTAGGATCATCAGCGTGTCTAAA  
 PRKAB1-F1: GTGAAGCGCCTTTGTGAGACC  
 PRKAB1-F2: TGTGATCCAGCTTTGCTCCC  
 PRKAB1-F3: CCATATGAAGAGGTGGGAGCC  
 PRKAB1-F4: TGTAGCCATCCTGGATCTGCC  
 PRKAB1-R1: ATTTCCCTCAGAGTGAAAGAGGTCCG  
 PRKAB1-R2: GCTCCCACCGCTTCATATGG  
 PRKAB1-R3: GAAAAATCTCCAGTTTATGGG  
 PRKAB1-R4: GGGAATCCACCATTAAAGCGTC  
 PRKAB1-Avr2: GACGACTGCCTAGGCTCTTCATATGGG  
 PRKAB1-Nco1: CTAATTAGCCATGGGCAACACGAGCAG  
 PRKAB2-F1: AGGCCCGGCCACTGTTATC  
 PRKAB2-F2: GCCATAATGACTTTGTTGCCATC  
 PRKAB2-F3: ACCTTTCCAGCTCACCCCCAG  
 PRKAB2-F4: TCCTAAGGCTCTGAAAGGATGAGTG  
 PRKAB2-F5: TTAACACAAAACCTTCCATATGTGTTGT  
 PRKAB2-R1: AGTGGAACTTTGGTGTCTCAATTG  
 PRKAB2-R2: ACCTCGACAAGATGTCTCTGAGC  
 PRKAB2-R3: CTTAATGGAACAATGCATAGAGATGG  
 PRKAB2-R4: GGTCCAGTCCAGAAAGGCAAGG  
 PRKAB2-R5f: CCAGATACCCATGAAAATTTAGCC  
 PRKAG1-F1: TGAGCAGTGTGAGGGCTG  
 PRKAG1-F2: GCTACTTCAGCACCCCTCAGGC  
 PRKAG1-F3: TCCCCTGCATGAATCTTCTCTC  
 PRKAG1-F4: GGAGGAAGCTACTAATCATCCCAC  
 PRKAG1-R1: GTGGAATCACCTGGCATTAGG  
 PRKAG1-R2: ACCACTGGCAGGGCTGAGAC  
 PRKAG1-R3: AGCTTTGGCAGGCAGTGAG  
 PRKAG1-R4: CAGTGTTCAAAAAAGTGGTTACC  
 PRKAG2-F1: ATGTCTGATATGCCAAAGCC  
 PRKAG2-F2: GTGCCAAAACAGAAGCAAACGG  
 PRKAG2-R1: CAAATTTGGAATAAATATCTACAAC  
 PRKAG2-R2: ATGCCGCTGTAAAATAACCAG  
 PRKAG3-F1: GCGCTCATGGAGCCCCG  
 PRKAG3-F1bis: CTGGAGCAGCTTTGGGGG  
 PRKAG3-F2: AGGTCCCCATTCCAGGGC  
 PRKAG3-F2bis: AGCACACCTGCTACGATGCC  
 PRKAG3-F2ter: GTGCGTCTGTACACTTAGGACT  
 PRKAG3-F3: AGGACAGGTCTGTTGGCCT  
 PRKAG3-F4: GCCCTCCTTCTCTACCCGCAC  
 PRKAG3-F5: AGGCCCTTTGCCCCGGTG  
 PRKAG3-F6: GCTGCTTTAAGCCTCTGGTCTCC  
 PRKAG3-F7: GAGGACCAAGGTCTCAAGATGG  
 PRKAG3-F8: CTCATGGATCCACTTGGATT  
 PRKAG3-F9: ACCTCTTAGCCCCAACCTGC  
 PRKAG3-F10: AGCACCTCCTGGGTGTAGTGTCC  
 PRKAG3-F11: GTCTACACCCTCATCAAGAACC  
 PRKAG3-F12: GTGGGTCACTCTTCTCCACACAG  
 PRKAG3-F13: GGCTCACGCAGATTCAGGC  
 PRKAG3-F14: CCGAGACTTGGCCGTGGTGTGGACAC  
 PRKAG3-F15: GTTCCTGCACATCTTTGTGAGCCCGGGC  
 PRKAG3-F16: AGCTGATGGAGAAGGGGCTG  
 PRKAG3-F17: GTTCAGGCAGGGGCTGTGGATT  
 PRKAG3-F18: CCACAACAGAACGAGACAGCTCCTCG  
 PRKAG3-F19: GCTCTCTCCCCTTGAACAGGTCCCCAG  
 PRKAG3-F20: CGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG  
 PRKAG3-F21: GCTATGGTCTATCTGATCTGAACGC  
 PRKAG3-F22: GCACGCACTGTGTGGGACC  
 PRKAG3-F24: CAGGCGCCGTGCTGCA



PRKAG3-F25: AGGTCTCAAGATGGAAAAGCC  
 PRKAG3-F26: GCACTGTGTGGGACCCCC  
 PRKAG3-F27: CGACTACTATAGGGCAAGCAG  
 PRKAG3-F28: AAGAGAGTTTCACTCAACTGCCTC  
 PRKAG3-F29: AGGGCTCTCAGAGAAGAAACCC  
 PRKAG3-F30: CCACAGCAGGGTCTTCTCTC  
 PRKAG3-F31: CAGGCATCAGGATTCATGTG  
 PRKAG3-F32: TCAGGGCTGGAGCAGCAG  
 PRKAG3-F33: GACACCCAATCAGAGAGAACCC  
 PRKAG3-F34: CGCCAGAATAGTGTGCTGCC  
 PRKAG3-F35: CCCCACAGCAGGGTCC  
 PRKAG3-R1: GCCTGGCAGCTCCCTTTC  
 PRKAG3-R1bis: GGTCCCCAAAGCTGCTCC  
 PRKAG3-R2: CCCACAAAGCTTGCTTCTTG  
 PRKAG3-R2bis: GTTCTTCCCTCCCGGATCGGGTTC  
 PRKAG3-R2bis: CTGTAGCATGGTGTCTGAAGATG  
 PRKAG3-R3: CGGGCAATCCGGTCTGATG  
 PRKAG3-R4: GGGAGCACAAGCAGGGCAGG  
 PRKAG3-R5: GTCCTGGGAGAGATGGAGACC  
 PRKAG3-R6: CCATACGTGTGTTGTAGC  
 PRKAG3-R7: CCTCAGCTGCCCCAGCTCC  
 PRKAG3-R8: CGCTAGGGCAGCGTCCATGG  
 PRKAG3-R9: GCTGAGCACTAGAGCTTGAAGGA  
 PRKAG3-R10: TACCAGCTTCGTTGATCACCG  
 PRKAG3-R11: GGGCAGCAGGGTGCCTGA  
 PRKAG3-R11b: GGGCAGCAGGGTGCAGAAAG  
 PRKAG3-R12: CAATCCATCCCCCATGCAC  
 PRKAG3-R13: CACCCAGCCACAATCCC  
 PRKAG3-R14: ATATGTCCAGCGCGGTGAGGATGGGTGACA  
 PRKAG3-R15: AGCCCTGACTCCATCCCGGATCTCGAGC  
 PRKAG3-R16: GTCCATAGACCCCGGCTCC  
 PRKAG3-R17: ACTCCCAAGTCAGACGTGG  
 PRKAG3-R17b: GAGCTAATGTCCATAGACCCCGGCTCCCC  
 PRKAG3-R18: CTGGAAGCGGAGGCTGTACAGTCGGA  
 PRKAG3-R19: ATGTAGACCTGAGCCCTGGCTTCCG  
 PRKAG3-R20: GACCTGTCCAGCTTCGTTGATCAC  
 PRKAG3-R21: GAGAAGCGGACAAAGCAGTG  
 PRKAG3-R22: GCTTATTTCTGCGCTGGTGGT  
 PRKAG3-R23: CTGGTGGTCATGGCTGGTG  
 PRKAG3-R24: GGCAGCAGGGTGCCTG  
 PRKAG3-R25: GAATGTGGCCTCCAGCC  
 PRKAG3-R26: CCCTCCCGGATCGGGTTC  
 PRKAG3-Avr2: GTTTAAGCCCTAGGTTCTCAGGCCCC  
 PRKAG3-BamH1: GGGAGACCACAAGGATCCCTCTAG  
 PRKAG3-Nde1: AATCTCTACATATGGAGCCCGCCGAG  
 PRKAG3-Not1.ATG:  
 AGATATTGCGGCCGCACCATGGAGCCCGCCG  
 PRKAG3-Not1.His:  
 AGACCTTGGCGCCGCACCATGTCTGGTTCTC  
 PRKAG3-Not1.TGA:  
 TAGACTCGAGCGGCCCTCAGGCCCAAGG  
 PRKAG3-Xho1: GTTTAAGCCTCGAGTTCTCAGGCCCC

### Amorces employées pour la quantification des transcrits des différents gènes de l'AMPK.

BqA1-F1: GATCACCCTTGACTCGGCC  
 BqA1-R1: CCGAACACGCAAATAATACGGG  
 BqA2-F1: GACAGCCCTAAAGCACGATGTC  
 BqA2-R1: GAACCAGACCTCTGCTCCACC  
 BqB1-F1: TCCAAGGATGGAGACAGGCC  
 BqB1-R1: GGGCAGGAGCTTTGTCGTTT  
 BqB2-F1: GCCATGCTCCGGGTAAGG  
 BqB2-R1: TGTGTGGGCTTTACGGAGTCC  
 BqG1-F2: CCCGGAATCAGGCAACACC  
 BqG1-R2: AAAGATGCCAGAGCCACG  
 BqG2-F2: TTCGATGCTGTGACTCGTTG  
 BqG2-R2: CTTTAAATGATGGGAGTGTCCGGG  
 BqG3-F1: GCGCTCATGGAGCCCGC  
 BqG3-R1: GCCTGGCAGCTCCCTTTC  
 GAPDH-F1: GTGAAGCAGGCGTCAGAGG  
 GAPDH-R1: TTGAAGTCGAGGAGACAACC

### Amorces employées pour la quantification des transcrits alternatifs du gène *PRKAG3*.

PRKAG3-I1F: TGGAGCACGCACTGTGT  
 PRKAG3-I1R: CGGGTCCCCCAAAGCT  
 Sonde I1: FAM-CTCTTCTCCACACAGACCC  
 PRKAG3-AI1F: GCGCACTCGCTCATGGA  
 PRKAG3-AI1R: CGGGTCCCCCAAAGCT  
 Sonde AI1: FAM-CACTGTGTGGGACCCC  
 PRKAG3-I2F: GGCTTCTCAAGTTCTGCACAT  
 PRKAG3-I2R: TGGTGCGGTAGAGGAAGGA  
 Sonde I2: FAM-CTTTCAGCGCACCCCTGC  
 PRKAG3-AI2F: CACACACAAACGGCTTCTCAAG  
 PRKAG3-AI2R: TGGTGCGGTAGAGGAAGGA  
 Sonde AI2: FAM-TTCTTGCACATCTTTTCGA

### Amorces employées pour la quantification des transcrits *PPARG* et des transcrits chimères.

PPARG-Fq1 : AGCCCTTTGGTACTTTATGGA  
 PPARG-Rq1 : TCCTCAATGGGCTTACGTT  
 PPARG-Fq2 : TGAAGTTCAACGCACTGGAATT  
 PPARG-Rq2 : CTGTCTGCACTCTTCTCTCTCT  
 GAPDH-F1: GTGAAGCAGGCGTCAGAGG  
 GAPDH-R1: TTGAAGTCGAGGAGACAACC

### Amorces employées pour le génotypage par TaqMan.

G3-CT-3718F: GGATGTGACTATACAGACTTCA  
 G3-CT-3718R: CCGCCCCAGTCCAGATG  
 Sonde allèle 1: VIC-CATCGCTATTACCGGTCC  
 Sonde allèle 2: FAM-CATCGCTATTACTGGTCC  
 G3-AG-1428F: GCCTCTGACTTGATCACATGTT  
 G3-AG-1428R: CTAACAAGGGACCTGAGATCAGAGA  
 Sonde allèle 1: VIC-CTGTGTGATCTGTAGCAA  
 Sonde allèle 2: FAM-CTGTGTGATCTGTGGCAA  
 G3-GC-3869F: TGTGATGTTCTAGTCCAGATCTATGA  
 G3-GC-3869R: CCCTTTCAGGACCCCTTTACC

Sonde allèle 1: VIC-CCCTCCAGGTCTCAA  
Sonde allèle 2: FAM-CCCTCCACGTCTCAA  
G3-GT-5851F:GACCTGAATCTTTCCCCTGTCTTTT  
G3-GT-5851R:AATCACATCAAAGCGGGAGTAGAG  
Sonde allèle 1: VIC-CCCCTGCCCTCC  
Sonde allèle 2: FAM-TCCCCCTTCCCCTCC  
G3-CT-3451F:CACCTCTATGGGACAGCAAGAAG  
G3-CT-3451R:CAGAATCGCCCCACAAGGT  
Sonde allèle 1: VIC-CCCACGAAGCTCT  
Sonde allèle 2: FAM-CCCACAAAGCTCT  
G3-GT-4649F:CCGGCCCTCCTTCCTCTA  
G3-GT-4649R:CGGCCAAGTCTCGGAATGT  
Sonde allèle 1: VIC-CCATCCAAGATCTGG  
Sonde allèle 2: FAM-ACCATCCAATATCTGG

### Amorces employées pour le génotypage par Amplifluor.

G3-4695-Fc: GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGCCGTGGTGCTGGAAAC  
G3-4695-Ft: GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTGGCCGTGGTGCTGGAAAT  
G3-4695-R: CCGGTCCACAAATATGTCCA

### Annexe 1: Amorces utilisées.

F=brin sens (forward), R= brin complémentaire (reverse).



Individus	1428	2260	2339	2343	2547	2643	3451	3718	3869	4649	4695	5851	Génotype
H01	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H02	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H03	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H04	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H05	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H06	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H07	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H08	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H09	A/A	G/G	G/G	A/A	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	FF
H10	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H11	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	C/C	T/T	C/C	C/C	G/G	C/C	T/T	HH
H12	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	BD
H13	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H14	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H15	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H16	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	C/C	T/T	C/C	C/C	G/G	C/C	T/T	HH
H17	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H18	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H19	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H20	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H21	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	Nd	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H22	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H23	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H24	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	Nd	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H25	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H26	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	C/T	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	DG
H27	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H28	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H29	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H30	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	Nd	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H31	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H32	G/A	G/T	G/G	G/G	G/G	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BJ
H33	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	C/T	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	DG
HV-1	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H65a	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H36	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H37	G/G	G/G	G/G	A/G	G/G	C/C	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	GH
H38	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H39	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H40	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BE
H41	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H42	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H43	A/A	Nd	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	Nd	G/G	C/C	Nd	BB
H44	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H45	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H46	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	BD
H47	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H48	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H49	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H50	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H51	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB

Individus	1428	2260	2339	2343	2547	2643	3451	3718	3869	4649	4695	5851	Génotype
H52	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H53	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H54	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	AA
H55	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H56	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	BD
H57	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H58	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BG
H59	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H60	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H61	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H62	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H63	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H64	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H65	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H66	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H67	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H68	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H69	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H70	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H71	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H72	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H73	G/G	G/G	G/G	A/A	G/G	C/C	T/T	C/C	C/C	G/G	C/C	T/T	HH
H74	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H75	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	C/C	G/G	C/C	G/G	CC
H76	G/G	G/T	G/G	A/G	G/T	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/G	IK
H77	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H78	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H79	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H80	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H81	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	DK
H82	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H83	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H84	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H85	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H86	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H87	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H88	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H89	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H90	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H91	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H92	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H93	G/A	G/G	G/G	A/G	G/G	C/T	C/T	C/C	G/C	G/G	C/C	G/T	BH
H94	G/A	G/T	G/G	G/G	G/T	C/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BK
H95	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	BD
H96	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H97	G/G	T/T	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	KK
H98	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H99	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	T/T	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	BB
H100	A/A	G/G	G/G	G/G	G/G	Nd	C/C	C/T	G/G	G/G	C/C	G/G	BD

Annexe 2 : Génotypage des polymorphismes de type SNP sur les 100 veaux Holstein. Pour chaque SNP, l'homozygote le plus fréquent est surligné en jaune, le moins fréquent en bleu et les hétérozygotes en vert. Les positions surlignées en orange représentent les positions où le SNP provoque un changement en acide aminé. En rouge sont indiqués les haplotypes F et H. Nd signifie non déterminé.



		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
1428 A/A	Moyenne	128,944	127,824	6,961	5,593	1,368	33,056	7,757	2,834	1,181	6,209
	Ecart type	14,231	14,485	0,197	0,186	0,144	17,194	6,843	0,657	0,126	1,897
1428 G/A	Moyenne	133,358	132,264	7,040	5,605	1,435	35,631	7,951	2,678	1,154	5,835
	Ecart type	13,467	13,465	0,167	0,234	0,206	14,254	7,439	0,657	0,172	1,906
1428 G/G	Moyenne	126,683	125,737	6,913	5,553	1,360	27,857	10,228	2,797	1,155	6,181
	Ecart type	6,266	5,354	0,229	0,267	0,215	18,169	5,967	0,519	0,117	0,622

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
2260 G/G	Moyenne	130,251	129,081	6,981	5,599	1,382	33,696	7,474	2,767	1,180	6,110
	Ecart type	13,004	13,115	0,193	0,192	0,158	16,806	6,339	0,628	0,135	1,834
2260 G/T	Moyenne	127,789	126,917	6,725	5,350	1,382	33,865	9,068	2,620	1,086	5,675
	Ecart type	28,912	28,818	1,402	1,129	0,347	13,299	8,410	0,804	0,266	2,069
2260 T/T	Moyenne	117,840	117,600	7,030	5,620	1,410	12,456	20,982	3,771	1,130	7,011
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
2343 A/A	Moyenne	128,335	126,385	6,900	5,640	1,260	19,931	7,178	2,338	1,255	5,589
	Ecart type	5,699	4,502	0,271	0,254	0,213	11,002	4,859	0,284	0,111	0,371
2343 A/G	Moyenne	132,828	131,816	7,039	5,573	1,466	40,254	6,635	2,733	1,185	5,783
	Ecart type	9,963	9,533	0,170	0,195	0,145	15,087	4,957	0,569	0,164	1,825
2343 G/G	Moyenne	130,191	129,115	6,983	5,599	1,385	32,928	8,360	2,799	1,160	6,145
	Ecart type	14,743	14,958	0,190	0,214	0,179	15,998	7,521	0,676	0,142	1,900

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
2547 G/G	Moyenne	130,439	129,250	6,986	5,604	1,382	33,951	7,527	2,763	1,181	6,058
	Ecart type	13,157	13,217	0,193	0,192	0,156	16,662	6,296	0,628	0,134	1,858
2547 G/T	Moyenne	131,888	131,088	7,007	5,564	1,443	34,256	9,066	2,738	1,125	5,992
	Ecart type	15,815	16,128	0,186	0,274	0,244	13,587	8,938	0,713	0,184	1,883
2547 T/T	Moyenne	117,840	117,600	7,030	5,620	1,410	12,456	20,982	3,771	1,130	7,011
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
2643 C/C	Moyenne	127,441	126,191	6,944	5,623	1,321	25,297	9,894	2,770	1,213	6,248
	Ecart type	5,937	5,265	0,200	0,189	0,175	16,024	6,141	0,620	0,109	0,929
2643 C/T	Moyenne	132,909	131,936	7,026	5,584	1,442	37,024	7,946	2,675	1,148	5,909
	Ecart type	13,605	13,621	0,170	0,237	0,205	14,357	7,527	0,659	0,167	1,910
2643 T/T	Moyenne	128,747	137,105	6,868	5,484	1,383	38,160	10,512	2,924	1,125	6,033
	Ecart type	14,838	12,317	0,202	0,164	0,135	11,909	7,986	0,424	0,152	1,725

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
3451 C/C	Moyenne	130,219	129,143	6,979	5,598	1,382	33,050	8,352	2,790	1,159	6,121
	Ecart type	14,736	14,949	0,189	0,214	0,178	15,816	7,528	0,683	0,141	1,899
3451 C/T	Moyenne	132,828	131,816	7,039	5,573	1,466	40,254	6,635	2,733	1,185	5,783
	Ecart type	9,963	9,533	0,170	0,195	0,145	15,087	4,957	0,569	0,164	1,825
3451 T/T	Moyenne	128,557	126,807	6,903	5,667	1,237	21,834	9,271	2,475	1,230	5,689
	Ecart type	6,959	5,417	0,332	0,304	0,254	12,642	3,024	0,088	0,121	0,382

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
3718 C/C	Moyenne	130,791	129,726	6,991	5,593	1,398	33,278	8,077	2,766	1,171	6,028
	Ecart type	13,892	14,039	0,192	0,209	0,181	15,088	7,188	0,659	0,148	1,914
3718 C/T	Moyenne	128,623	127,138	6,983	5,621	1,361	39,799	6,926	2,788	1,143	6,349
	Ecart type	11,551	11,141	0,173	0,238	0,146	25,362	4,594	0,545	0,123	0,727

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
3869 C/C	Moyenne	137,980	136,805	6,840	5,613	1,228	23,109	12,678	2,412	1,198	5,779
	Ecart type	19,685	20,480	0,299	0,271	0,208	10,633	7,248	0,145	0,118	0,360
3869 G/C	Moyenne	132,828	131,816	7,039	5,573	1,466	40,254	6,635	2,733	1,185	5,783
	Ecart type	9,963	9,533	0,170	0,195	0,145	15,087	4,957	0,569	0,164	1,825
3869 G/G	Moyenne	129,831	128,729	6,984	5,598	1,387	32,855	8,202	2,801	1,159	6,152
	Ecart type	14,204	14,381	0,186	0,213	0,179	16,177	7,421	0,683	0,144	1,915



		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
5851 G/G	Moyenne	130,229	129,149	6,976	5,590	1,386	32,878	8,243	2,780	1,159	6,143
	Ecart type	14,619	14,836	0,189	0,215	0,179	16,260	7,529	0,677	0,143	1,890
5851 G/T	Moyenne	133,172	132,084	7,055	5,594	1,461	39,203	6,781	2,740	1,194	5,748
	Ecart type	10,135	9,736	0,160	0,178	0,148	14,791	5,059	0,584	0,164	1,871
5851 T/T	Moyenne	128,557	126,807	6,903	5,667	1,237	21,834	9,271	2,475	1,230	5,689
	Ecart type	6,959	5,417	0,332	0,304	0,254	12,642	3,024	0,088	0,121	0,382

		Poids CC	Poids CF	pH1	pH24	Chute pH	Glycogène	Lactate	Perte Steak	PRE	Perte LD
Gen A/A	Moyenne	130,950	130,800	7,00 0	5,680	1,320	54,880	11,007	3,289	1,260	7,772
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen B/B	Moyenne	128,136	126,999	6,96 8	5,600	1,368	31,502	7,510	2,821	1,183	6,206
	Ecart type	13,934	14,145	0,20 2	0,195	0,151	15,640	6,922	0,676	0,128	2,053
Gen B/D	Moyenne	128,146	126,798	6,94 0	5,546	1,394	46,492	7,512	3,080	1,136	5,974
	Ecart type	13,700	13,525	0,19 0	0,173	0,126	27,203	4,598	0,465	0,140	0,647
Gen B/E	Moyenne	130,420	130,000	7,10 0	5,620	1,480	37,357	8,326	3,256	1,210	7,051
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen B/G	Moyenne	136,420	136,200	6,94 0	5,490	1,450	48,676	0,990	2,130	1,020	6,274
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen BH	Moyenne	133,361	132,242	7,05 9	5,599	1,460	39,743	6,676	2,726	1,201	5,698
	Ecart type	10,414	10,011	0,16 4	0,181	0,152	15,062	5,195	0,599	0,167	1,917
Gen B/J	Moyenne	154,040	150,960	7,08 0	5,760	1,320	42,885	13,426	1,988	1,140	2,430
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen BK	Moyenne	132,727	131,813	7,02 4	5,585	1,439	31,988	9,485	2,760	1,121	5,933
	Ecart type	16,410	16,802	0,18 5	0,274	0,256	12,118	9,311	0,748	0,189	1,975
Gen C/C	Moyenne	166,250	166,800	6,65 0	5,450	1,200	26,935	22,900	2,223	1,100	6,048
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen D/G	Moyenne	133,520	130,855	7,12 0	5,860	1,260	16,745	5,848	2,225	1,085	7,119
	Ecart type	8,895	8,719	0,11 3	0,354	0,240	9,789	7,649	0,196	0,007	0,153
Gen D/K	Moyenne	121,210	121,400	6,92 0	5,520	1,400	52,441	6,151	2,452	1,290	6,682
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen F/F	Moyenne	127,670	125,120	6,89 0	5,560	1,330	14,221	0,901	1,926	1,330	5,288
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Gen G/H	Moyenne	129,960	129,400	6,98 0	5,500	1,480	30,018	8,559	2,978	1,080	6,598
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen H/H	Moyenne	128,557	126,807	6,90 3	5,667	1,237	21,834	9,271	2,475	1,230	5,689
	Ecart type	6,959	5,417	0,33 2	0,304	0,254	12,642	3,024	0,088	0,121	0,382
Gen I/K	Moyenne	126,630	127,000	6,76 0	5,200	1,560	59,167	4,017	2,608	1,030	6,413
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Gen K/K	Moyenne	117,840	117,600	7,03 0	5,620	1,410	12,456	20,982	3,771	1,130	7,011
	Ecart type	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Annexe 3 : Calcul des moyennes et des écarts type de chaque variable pour chaque polymorphisme sur la totalité des individus.



# *Références Bibliographiques*



- Andersson L. (2003). "Identification and characterization of AMPK gamma3 mutations in the pig." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 232-5.
- Andersson L. and Georges M. (2004). "Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits." Nat Rev Genet **5**(3): 202-12.
- Arad M., Benson D. W., Perez-Atayde A. R., McKenna W. J., Sparks E. A., Kanter R. J., McGarry K., Seidman J. G. and Seidman C. E. (2002). "Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy." J Clin Invest **109**(3): 357-62.
- Arad M., Moskowitz I. P., Patel V. V., Ahmad F., Perez-Atayde A. R., Sawyer D. B., Walter M., Li G. H., Burgon P. G., Maguire C. T., Stapleton D., Schmitt J. P., Guo X. X., Pizard A., Kupersmidt S., Roden D. M., Berul C. I., Seidman C. E. and Seidman J. G. (2003). "Transgenic mice overexpressing mutant PRKAG2 define the cause of Wolff-Parkinson-White syndrome in glycogen storage cardiomyopathy." Circulation **107**(22): 2850-6.
- Auboeuf D., Rieusset J., Fajas L., Vallier P., Frering V., Riou J. P., Staels B., Auwerx J., Laville M. and Vidal H. (1997). "Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients." Diabetes **46**(8): 1319-27.
- Auwerx J. (1999). "PPARgamma, the ultimate thrifty gene." Diabetologia **42**(9): 1033-49.
- Barnes B. R., Glund S., Long Y. C., Hjalml G., Andersson L. and Zierath J. R. (2005). "5'-AMP-activated protein kinase regulates skeletal muscle glycogen content and ergogenics." Faseb J **19**(7): 773-9.
- Barnes B. R., Marklund S., Steiler T. L., Walter M., Hjalml G., Amarger V., Mahlapuu M., Leng Y., Johansson C., Galuska D., Lindgren K., Abrink M., Stapleton D., Zierath J. R. and Andersson L. (2004). "The AMPK-gamma 3 isoform has a key role for carbohydrate and lipid metabolism in glycolytic skeletal muscle." J Biol Chem.
- Beg Z. H., Allmann D. W. and Gibson D. M. (1973). "Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and wth protein fractions of rat liver cytosol." Biochem Biophys Res Commun **54**(4): 1362-9.
- Bendall J. R. (1973). Post mortem changes in muscles. In : G.H. Bourne (ed), The structure and function of muscle, 2nd Ed., Academic Press, New York.
- Benkel B., Kollers S., Fries R., Sazanov A., Yoshida E., Valle E., Davoren J. and Hickey D. (2005). "Characterization of the bovine ampkgamma1 gene." Mamm Genome **16**(3): 194-200.
- Bergeron R., Russell R. R., 3rd, Young L. H., Ren J. M., Marcucci M., Lee A. and Shulman G. I. (1999). "Effect of AMPK activation on muscle glucose metabolism in conscious rats." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): E938-44.

- Boudeau J., Sapkota G. and Alessi D. R. (2003). "LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity." FEBS Lett **546**(1): 159-65.
- Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brooke M. M. and Kaiser K. (1970). "Muscle fiber type: how many and what kind?" Arch. Neurology **23**: 369-370.
- Bruce H. L. and Ball R. O. (1990). "Postmortem interactions of muscle temperature, pH and extension on beef quality." J Anim Sci **68**(12): 4167-75.
- Brunmair B., Gras F., Wagner L., Artwohl M., Zierhut B., Waldhausl W. and Furnsinn C. (2004). "Expression of uncoupling protein-3 mRNA in rat skeletal muscle is acutely stimulated by thiazolidinediones: an exercise-like effect?" Diabetologia **47**(9): 1611-4.
- Cargill M., Altshuler D., Ireland J., Sklar P., Ardlie K., Patil N., Shaw N., Lane C. R., Lim E. P., Kalyanaraman N., Nemesh J., Ziaugra L., Friedland L., Rolfe A., Warrington J., Lipshutz R., Daley G. Q. and Lander E. S. (1999). "Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes." Nat Genet **22**(3): 231-8.
- Carlson C. A. and Kim K. H. (1973). "Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation." J Biol Chem **248**(1): 378-80.
- Cassens R. G. and Cooper C. C. (1971). "Red and white muscle." Adv. Food Res. **19**: 1-74.
- Charpentier J. (1966). "Pigmentation musculaire des veaux de boucherie. II - Influence d'une supplémentation en fer sur la teneur en fer de certains muscles." Ann. Zootech. **15**: 361-366.
- Charpentier J. (1968). "Glycogénolyse post-mortem du muscle Longissimus dorsi de porc." Ann. Zootech. **17**: 429-443.
- Chen J. M., Chuzhanova N., Stenson P. D., Ferec C. and Cooper D. N. (2005). "Complex gene rearrangements caused by serial replication slippage." Hum Mutat **26**(2): 125-34.
- Chen Z., Heierhorst J., Mann R. J., Mitchelhill K. I., Mitchell B. J., Witters L. A., Lynch G. S., Kemp B. E. and Stapleton D. (1999). "Expression of the AMP-activated protein kinase beta1 and beta2 subunits in skeletal muscle." FEBS Lett **460**(2): 343-8.
- Cheung P. C., Salt I. P., Davies S. P., Hardie D. G. and Carling D. (2000). "Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding." Biochem J **346 Pt 3**: 659-69.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Ciobanu D., Bastiaansen J., Malek M., Helm J., Woollard J., Plastow G. and Rothschild M. (2001). "Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality." Genetics **159**(3): 1151-62.

- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe B., Bouix J., Caiment F., Elsen J. M., Eycheenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C. and Georges M. (2006). "A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep." *Nat Genet* **38**(7): 813-8.
- Comeron J. M. and Aguade M. (1998). "An evaluation of measures of synonymous codon usage bias." *J Mol Evol* **47**(3): 268-74.
- Communi D., Suarez-Huerta N., Dussosoy D., Savi P. and Boeynaems J. M. (2001). "Cotranscription and intergenic splicing of human P2Y11 and SSF1 genes." *J Biol Chem* **276**(19): 16561-6.
- Cong L. N., Chen H., Li Y., Zhou L., McGibbon M. A., Taylor S. I. and Quon M. J. (1997). "Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells." *Mol Endocrinol* **11**(13): 1881-90.
- Corton J. M., Gillespie J. G., Hawley S. A. and Hardie D. G. (1995). "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?" *Eur J Biochem* **229**(2): 558-65.
- Cross D. A., Alessi D. R., Cohen P., Andjelkovich M. and Hemmings B. A. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378**(6559): 785-9.
- Dagert M. and Ehrlich S. D. (1979). "Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells." *Gene* **6**(1): 23-8.
- Demeyer D. and Doreau M. (1999). "Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids." *Proc Nutr Soc* **58**(3): 593-607.
- Derave W., Ai H., Ihlemann J., Witters L. A., Kristiansen S., Richter E. A. and Ploug T. (2000). "Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle." *Diabetes* **49**(8): 1281-7.
- Doney A. S., Fischer B., Cecil J. E., Boylan K., McGuigan F. E., Ralston S. H., Morris A. D. and Palmer C. N. (2004). "Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes." *Diabetologia*.
- Dransfield E. (1993). "Modelling post-mortem tenderisation. 4. Role of calpains and calpastatin in conditioning." *Meat Sci* **34**: 217-234.
- Duret L. (2000). "tRNA gene number and codon usage in the C. elegans genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes." *Trends Genet* **16**(7): 287-9.
- Duris M. P., Renand G. and Picard B. (1999). "Genetic variability of foetal bovine myoblasts in primary culture." *Histochem. J.* **31**(753-760).
- Eikelenboom G. and Minkema D. (1974). "Prediction of pale, soft, exsudative muscle with a non-lethal test for the halothane-induced porcine malignant hyperthermia syndrome." *Tijdschr. Diergeneesk.* **99**: 421-426.



Estrade M., Vignon X., Rock E. and Monin G. (1993). "Glycogen hyperaccumulation in white muscle fibres of RN- carrier pigs. A biochemical and ultrastructural study." Comp Biochem Physiol B **104**(2): 321-6.

Fajas L., Auboeuf D., Raspe E., Schoonjans K., Lefebvre A. M., Saladin R., Najib J., Laville M., Fruchart J. C., Deeb S., Vidal-Puig A., Flier J., Briggs M. R., Staels B., Vidal H. and Auwerx J. (1997). "The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene." J Biol Chem **272**(30): 18779-89.

Fajas L., Fruchart J. C. and Auwerx J. (1998). "PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter." FEBS Lett **438**(1-2): 55-60.

Fernandez X., Monin G., Culioli J., Legrand I. and Quilichini Y. (1996). "Effect of duration of feed withdrawal and transportation time on muscle characteristics and quality in Friesian-Holstein calves." J Anim Sci **74**(7): 1576-83.

Fernandez X., Mourot J., Mounier A. and Ecolan P. (1995). "Effect of muscle type and food deprivation for 24 h on the composition of the lipidic fraction in muscles of Large White pigs." Meat Sci. **41**: 335-343.

Finta C. and Zaphiropoulos P. G. (2000). "The human CYP2C locus: a prototype for intergenic and exon repetition splicing events." Genomics **63**(3): 433-8.

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**(10): 1496-506.

Fryer L. G., Fougere F., Barnes K., Baldwin S. A., Woods A. and Carling D. (2002). "Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells." Biochem J **363**(Pt 1): 167-74.

Fryer L. G., Parbu-Patel A. and Carling D. (2002). "Protein kinase inhibitors block the stimulation of the AMP-activated protein kinase by 5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside." FEBS Lett **531**(2): 189-92.

Gampe R. T., Jr., Montana V. G., Lambert M. H., Miller A. B., Bledsoe R. K., Milburn M. V., Kliewer S. A., Willson T. M. and Xu H. E. (2000). "Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors." Mol Cell **5**(3): 545-55.

Ghoussaini M., Meyre D., Lobbens S., Charpentier G., Clement K., Charles M. A., Tauber M., Weill J. and Froguel P. (2005). "Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population." BMC Med Genet **6**: 11.

Gollob M. H., Green M. S., Tang A. S., Gollob T., Karibe A., Ali Hassan A. S., Ahmad F., Lozado R., Shah G., Fananapazir L., Bachinski L. L., Roberts R. and Hassan A. S. (2001). "Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome." N Engl J Med **344**(24): 1823-31.

- 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-muscling phenotype in cattle." Nat Genet **17**(1): 71-4.
- Halushka M. K., Fan J. B., Bentley K., Hsie L., Shen N., Weder A., Cooper R., Lipshutz R. and Chakravarti A. (1999). "Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis." Nat Genet **22**(3): 239-47.
- Hamilton S. R., O'Donnell J. B., Jr., Hammet A., Stapleton D., Habinowski S. A., Means A. R., Kemp B. E. and Witters L. A. (2002). "AMP-activated protein kinase kinase: detection with recombinant AMPK alpha1 subunit." Biochem Biophys Res Commun **293**(3): 892-8.
- Hamilton S. R., Stapleton D., O'Donnell J. B., Jr., Kung J. T., Dalal S. R., Kemp B. E. and Witters L. A. (2001). "An activating mutation in the gamma1 subunit of the AMP-activated protein kinase." FEBS Lett **500**(3): 163-8.
- Hardie D. G. (2005). "New roles for the LKB1-->AMPK pathway." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 167-73.
- Hardie D. G. (2003). "The AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status." Endocrinology.
- Hardie D. G. and Carling D. (1997). "The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?" Eur J Biochem **246**(2): 259-73.
- Hardie D. G., Carling D. and Carlson M. (1998). "The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?" Annu Rev Biochem **67**: 821-55.
- Hardie D. G., Carling D. and Sim A. T. R. (1989). "The AMP-activated protein kinase: a multisubstrate regulator of lipid metabolism." Trends in Biochemical Sciences **14**(1): 20-23.
- Hardie D. G. and Hawley S. A. (2001). "AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited." Bioessays **23**(12): 1112-9.
- Hawley J. A. (2004). "Exercise as a therapeutic intervention for the prevention and treatment of insulin resistance." Diabetes Metab Res Rev **20**(5): 383-93.
- Hawley S. A., Davison M., Woods A., Davies S. P., Beri R. K., Carling D. and Hardie D. G. (1996). "Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **271**(44): 27879-87.
- Hawley S. A., Pan D. A., Mustard K. J., Ross L., Bain J., Edelman A. M., Frenguelli B. G. and Hardie D. G. (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." Cell Metab **2**(1): 9-19.
- Hayashi T., Hirshman M. F., Kurth E. J., Winder W. W. and Goodyear L. J. (1998). "Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport." Diabetes **47**(8): 1369-73.

- Heaton M. P., Grosse W. M., Kappes S. M., Keele J. W., Chitko-McKown C. G., Cundiff L. V., Braun A., Little D. P. and Laegreid W. W. (2001). "Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes." Mamm Genome **12**(1): 32-7.
- Hegele R. A., Cao H., Harris S. B., Zinman B., Hanley A. J. and Anderson C. M. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 P12A and type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree." J Clin Endocrinol Metab **85**(5): 2014-9.
- Hemminki A., Markie D., Tomlinson I., Avizienyte E., Roth S., Loukola A., Bignell G., Warren W., Aminoff M., Hoglund P., Jarvinen H., Kristo P., Pelin K., Ridanpaa M., Salovaara R., Toro T., Bodmer W., Olschwang S., Olsen A. S., Stratton M. R., de la Chapelle A. and Aaltonen L. A. (1998). "A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome." Nature **391**(6663): 184-7.
- Henin N., Vincent M. F. and Van den Berghe G. (1996). "Stimulation of rat liver AMP-activated protein kinase by AMP analogues." Biochim Biophys Acta **1290**(2): 197-203.
- Hocquette J. F., Balage M. and Ferré P. (1996). "Facilitative glucose transporters in ruminants." Proc. Nutr. Soc. **55**: 221-236.
- Hocquette J. F., Bornes F., Balage M., Ferre P., Grizard J. and Vermorel M. (1995). "Glucose-transporter (GLUT4) protein content in oxidative and glycolytic skeletal muscles from calf and goat." Biochem J **305** ( Pt 2): 465-70.
- Hocquette J.-F., Ortigues-Marty I., Damon M., Herpin P. and Geay Y. (2000). "Métabolisme énergétique des muscles squelettiques chez les animaux producteurs de viande." INRA Prod. Anim. **13**(3): 185-200.
- Hocquette J. F., Ortigues-Marty I., Pethick D., Herpin P. and Fernandez X. (1998). "Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals." Livest.Prod.Sci. **56**: 115-143.
- Hocquette J. F., Picard B. and Fernandez X. (1996). "Le métabolisme énergétique musculaire au cours de la croissance et après abattage de l'animal." Viandes Prod. Carnés **17**: 217-230.
- Holman G. D., Kozka I. J., Clark A. E., Flower C. J., Saltis J., Habberfield A. D., Simpson I. A. and Cushman S. W. (1990). "Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester." J Biol Chem **265**(30): 18172-9.
- Holmes B. F., Kurth-Kraczek E. J. and Winder W. W. (1999). "Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle." J Appl Physiol **87**(5): 1990-5.
- Hong S. P., Leiper F. C., Woods A., Carling D. and Carlson M. (2003). "Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8839-43.

- Hudson E. R., Pan D. A., James J., Lucocq J. M., Hawley S. A., Green K. A., Baba O., Terashima T. and Hardie D. G. (2003). "A Novel Domain in AMP-Activated Protein Kinase Causes Glycogen Storage Bodies Similar to Those Seen in Hereditary Cardiac Arrhythmias." Curr Biol **13**(10): 861-6.
- Jeon J. T., Amarger V., Rogel-Gaillard C., Robic A., Bongcam-Rudloff E., Paul S., Looft C., Milan D., Chardon P. and Andersson L. (2001). "Comparative analysis of a BAC contig of the porcine RN region and the human transcript map: implications for the cloning of trait loci." Genomics **72**(3): 297-303.
- Johansson A., Hampel H., Faltraco F., Buerger K., Minthon L., Bogdanovic N., Sjogren M., Zetterberg H., Forsell L., Lilius L., Wahlund L. O., Rymo L., Prince J. A. and Blennow K. (2003). "Increased frequency of a new polymorphism in the cell division cycle 2 (cdc2) gene in patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." Neurosci Lett **340**(1): 69-73.
- Kemp B. E., Mitchelhill K. I., Stapleton D., Michell B. J., Chen Z. P. and Witters L. A. (1999). "Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase." Trends Biochem Sci **24**(1): 22-5.
- Kessler A., Tomas E., Immler D., Meyer H. E., Zorzano A. and Eckel J. (2000). "Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin." Diabetologia **43**(12): 1518-27.
- Kimura N., Tokunaga C., Dalal S., Richardson C., Yoshino K., Hara K., Kemp B. E., Witters L. A., Mimura O. and Yonezawa K. (2003). "A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway." Genes Cells **8**(1): 65-79.
- Klosowska D., Klosowski B. and Kortz J. (1975). "Relation between histological picture of musculus Longissimus dorsi and meat quality properties." Proc. of the European Meeting of Meat Research Workers **21**: 73-75.
- Knight J. B., Cao K. T., Gibson G. V. and Olson A. L. (2000). "Expression of a prenylation-deficient Rab4 interferes with propagation of insulin signaling through insulin receptor substrate-1." Endocrinology **141**(1): 208-18.
- Kolfschoten G. M., Pradet-Balade B., Hahne M. and Medema J. P. (2003). "TWE-PRIL; a fusion protein of TWEAK and APRIL." Biochem Pharmacol **66**(8): 1427-32.
- Konfortov B. A., Licence V. E. and Miller J. R. (1999). "Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon." Mamm Genome **10**(12): 1142-5.
- Kruglyak L. and Nickerson D. A. (2001). "Variation is the spice of life." Nat Genet **27**(3): 234-6.
- Kurth-Kraczek E. J., Hirshman M. F., Goodyear L. J. and Winder W. W. (1999). "5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle." Diabetes **48**(8): 1667-71.
- Laborde D., Talmant A. and Monin G. (1985). "Activités enzymatiques métaboliques et contractiles de 30 muscles de porc. Relations avec le pH ultime atteint après la mort." Reprod. Nutr. Develop. **25**: 619-628.

- Lareau L. F., Green R. E., Bhatnagar R. S. and Brenner S. E. (2004). "The evolving roles of alternative splicing." Curr Opin Struct Biol **14**(3): 273-82.
- Larzul C., Le Roy P., Monin G. and Sellier P. (1998). "Variabilité génétique du potentiel glycolitique du muscle chez le porc." INRA Prod. Anim. **11**(3): 183-197.
- Le Roy P., Naveau J., Elsen J. M. and Sellier P. (1990). "Evidence for a new major gene influencing meat quality in pigs." Genet Res **55**(1): 33-40.
- Lebret B., Lefaucheur L. and Mourot J. (1999). "La qualité de la viande de porc. Influence des facteurs d'élevage non génétiques sur les caractéristiques du tissu musculaire." INRA Prod. Anim. **12**: 11-28.
- Lebret B. and Mourot J. (1998). "Caractéristiques et qualité des tissus adipeux chez le porc. Facteurs de variation non génétiques." INRA Prod. Anim. **11**: 131-143.
- Lee Y. B. and Kauffman R. G. (1974). "Cellular and enzymatic changes with animal growth in porcine intramuscular adipose tissue." J. Anim. Sci. **38**: 532-537.
- Lefaucheur L., Le Dividich J., Mourot J., Monin G., Ecolan P. and Krauss D. (1991). "Influence of environmental temperature on growth, muscle and adipose tissue metabolism, and meat quality in swine." J Anim Sci **69**(7): 2844-54.
- Leseigneur-Meynier A. and Gandemer G. (1991). "Lipid composition of pork muscle in relation to the metabolic type of the fibers." Meat Sci. **29**: 229-241.
- Long Y. C., Barnes B. R., Mahlapuu M., Steiler T. L., Martinsson S., Leng Y., Wallberg-Henriksson H., Andersson L. and Zierath J. R. (2005). "Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle." Diabetologia **48**(11): 2354-64.
- Mahlapuu M., Johansson C., Lindgren K., Hjalms G., Barnes B. R., Krook A., Zierath J. R., Andersson L. and Marklund S. (2004). "Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(2): E194-200.
- Mandel M. and Higa A. (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol **53**(1): 159-62.
- Marette A., Burdett E., Douen A., Vranic M. and Klip A. (1992). "Insulin induces the translocation of GLUT4 from a unique intracellular organelle to transverse tubules in rat skeletal muscle." Diabetes **41**(12): 1562-9.
- McKay S. D., White S. N., Kata S. R., Loan R. and Womack J. E. (2003). "The bovine 5' AMPK gene family: mapping and single nucleotide polymorphism detection." Mamm Genome **14**(12): 853-8.
- McKay S. D. and Womack J. E. (2002). The AMPK gene family in cattle: Mapping and SNP detection. XXVIII International Conference on Animal Genetics. ISAG-International Society for Animal Genetics., Göttingen. Germany.

- Merrill G. F., Kurth E. J., Hardie D. G. and Winder W. W. (1997). "AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle." Am J Physiol **273**(6 Pt 1): E1107-12.
- Miinea C. P., Sano H., Kane S., Sano E., Fukuda M., Peranen J., Lane W. S. and Lienhard G. E. (2005). "AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain." Biochem J **391**(Pt 1): 87-93.
- 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**(5469): 1248-51.
- Milan D., Woloszyn N., Yerle M., Le Roy P., Bonnet M., Riquet J., Lahbib-Mansais Y., Caritez J. C., Robic A., Sellier P., Elsen J. M. and Gellin J. (1996). "Accurate mapping of the "acid meat" RN gene on genetic and physical maps of pig chromosome 15." Mamm Genome **7**(1): 47-51.
- Millar J. K., Christie S., Semple C. A. and Porteous D. J. (2000). "Chromosomal location and genomic structure of the human translin-associated factor X gene (TRAX; TSNAX) revealed by intergenic splicing to DISC1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia." Genomics **67**(1): 69-77.
- Minelli G., Culioli J., Vignon X. and Monin G. (1995). "post mortem changes in the mechanical properties and ultrastructure of the Longissimus in two porcine breeds." J. Muscle Foods **6**: 313-326.
- Minokoshi Y., Kim Y. B., Peroni O. D., Fryer L. G., Muller C., Carling D. and Kahn B. B. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature **415**(6869): 339-43.
- Monin G. (1988). "Stress d'abattage et qualités de la viande." Rec. Méd. Vét. **164**: 835-842.
- Monin G. (1991). "Facteurs biologiques des qualités de la viande bovine." INRA Prod. Anim. **4**: 151-160.
- Monin G., Larzul C., Le Roy P., Culioli J., Mourot J., Rousset-Akrim S., Talmant A., Touraille C. and Sellier P. (1999). "Effects of the halothane genotype and slaughter weight on texture of pork." J Anim Sci **77**(2): 408-15.
- Monin G., Mejenes-Quijano A., Talmant A. and Sellier P. (1987). "Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs." Meat Sci **20**: 149-158.
- Monin G. and Sellier P. (1985). "Pork of low technological quality with a normal rate of muscle pH fall in the immediate post mortem period: the case of the Hampshire breed." Meat Sci. **13**: 49-63.
- Monod J., Wyman J. and Changeux J. P. (1965). "On the nature of allosteric transitions: a plausible model." J Mol Biol **12**: 88-118.

- Moore F., Weekes J. and Hardie D. G. (1991). "Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion." Eur J Biochem **199**(3): 691-7.
- Mottram D. S. and Edwards R. A. (1983). "The role of triglycerides and phospholipids in the aroma of cooked beef." J. Sci. Food Agric. **34**: 517-522.
- Mu J., Brozinick J. T., Jr., Valladares O., Bucan M. and Birnbaum M. J. (2001). "A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle." Mol Cell **7**(5): 1085-94.
- Mukherjee R., Jow L., Croston G. E. and Paterniti J. R., Jr. (1997). "Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR $\gamma$ 2 versus PPAR $\gamma$ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists." J Biol Chem **272**(12): 8071-6.
- Musi N., Fujii N., Hirshman M. F., Ekberg I., Froberg S., Ljungqvist O., Thorell A. and Goodyear L. J. (2001). "AMP-activated protein kinase (AMPK) is activated in muscle of subjects with type 2 diabetes during exercise." Diabetes **50**(5): 921-7.
- Nave B. T., Ouwens M., Withers D. J., Alessi D. R. and Shepherd P. R. (1999). "Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation." Biochem J **344 Pt 2**: 427-31.
- Naveau J., Pommeret P. and Lechaux P. (1985). "Proposition d'une méthode de mesure du rendement technologique : la "méthode Napole"." Techni-porc **8**(6): 7-13.
- Nelson M. R., Marnellos G., Kammerer S., Hoyal C. R., Shi M. M., Cantor C. R. and Braun A. (2004). "Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions." Genome Res **14**(8): 1664-8.
- Nesher R., Karl I. E. and Kipnis D. M. (1985). "Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle." Am J Physiol **249**(3 Pt 1): C226-32.
- Neumann D., Woods A., Carling D., Wallimann T. and Schlattner U. (2003). "Mammalian AMP-activated protein kinase: functional, heterotrimeric complexes by co-expression of subunits in Escherichia coli." Protein Expr Purif **30**(2): 230-7.
- Offer G. and Knight P. (1988). "The structural basis of WHC in meat." Develop. Meat Sci. **4**(1): 63-243.
- Offer G., Knight P., Jeacocke R., Almond R., Cousins T., Elsey J., Parsons N., Sharp A., Starr R. and Purslow P. (1989). "The structural basis of the water-holding, appearance and toughness of meat and meat products." Food Microstr. **8**: 151-170.
- Ouali A. (1991). "Conséquences des traitements technologiques sur la qualité de la viande." INRA Prod. Anim. **4**: 195-208.

- Parham P. and Ohta T. (1996). "Population biology of antigen presentation by MHC class I molecules." *Science* **272**(5258): 67-74.
- Park K. S., Ciaraldi T. P., Abrams-Carter L., Mudaliar S., Nikoulina S. E. and Henry R. R. (1997). "PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects." *Diabetes* **46**(7): 1230-4.
- Picard B., Jurie C., I. C.-M., Hocquette J.-F., Levaucheur L., Berri C., Duclos M. J., Alami-Durante H. and Rescan P. Y. (2003). "Typologie et ontogenèse des fibres musculaires chez différentes espèces d'intérêt agronomique." *INRA Prod Anim* **16**(2): 117-123.
- Ploug T., Galbo H. and Richter E. A. (1984). "Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin." *Am J Physiol* **247**(6 Pt 1): E726-31.
- Polekhina G., Gupta A., Michell B. J., van Denderen B., Murthy S., Feil S. C., Jennings I. G., Campbell D. J., Witters L. A., Parker M. W., Kemp B. E. and Stapleton D. (2003). "AMPK beta Subunit Targets Metabolic Stress Sensing to Glycogen." *Curr Biol* **13**(10): 867-71.
- Poulin F., Brueschke A. and Sonenberg N. (2003). "Gene fusion and overlapping reading frames in the mammalian genes for 4E-BP3 and MASK." *J Biol Chem* **278**(52): 52290-7.
- Pradet-Balade B., Medema J. P., Lopez-Fraga M., Lozano J. C., Kolfschoten G. M., Picard A., Martinez A. C., Garcia-Sanz J. A. and Hahne M. (2002). "An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein." *Embo J* **21**(21): 5711-20.
- Purchas R. W. and Aungsupakorn R. (1993). "Further investigations into the relationship between ultimate pH and tenderness for beef samples from bulls and steers." *Meat Sci.* **34**: 163-178.
- Ramachandran S. and Bell R. B. (1995). "Heat shock protein 70 gene polymorphisms and multiple sclerosis." *Tissue Antigens* **46**(2): 140-1.
- Renner M. and Valin C. (1979). "Influence de l'âge sur les caractéristiques de la viande bovine de race Limousine." *Ann. Technol. Agric.* **28**: 319-332.
- Richter E. A., Ploug T. and Galbo H. (1985). "Increased muscle glucose uptake after exercise. No need for insulin during exercise." *Diabetes* **34**(10): 1041-8.
- Rieusset J., Chambrier C., Bouzakri K., Dusserre E., Auwerx J., Riou J. P., Laville M. and Vidal H. (2001). "The expression of the p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase is induced by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human adipocytes." *Diabetologia* **44**(5): 544-54.
- Rieusset J., Roques M., Bouzakri K., Chevillotte E. and Vidal H. (2001). "Regulation of p85alpha phosphatidylinositol-3-kinase expression by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human muscle cells." *FEBS Lett* **502**(3): 98-102.
- Roux M., Leveziel H. and Amarger V. (2006). "Cotranscription and intergenic splicing of the PPARG and TSEN2 genes in cattle." *BMC Genomics* **7**: 71.



- Roux M., Nizou A., Forestier L., Ouali A., Leveziel H. and Amarger V. (2006). "Characterization of the bovine PRKAG3 gene: structure, polymorphism, and alternative transcripts." Mamm Genome **17**(1): 83-92.
- Russell R. R., 3rd, Bergeron R., Shulman G. I. and Young L. H. (1999). "Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR." Am J Physiol **277**(2 Pt 2): H643-9.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Erlich H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Sakamoto K., Zarrinpashneh E., Budas G. R., Pouleur A. C., Dutta A., Prescott A. R., Vanoverschelde J. L., Ashworth A., Jovanovic A., Alessi D. R. and Bertrand L. (2005). "Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPK[alpha]2 but not AMPK[alpha]1." Am J Physiol Endocrinol Metab.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sano H., Kane S., Sano E., Miinea C. P., Asara J. M., Lane W. S., Garner C. W. and Lienhard G. E. (2003). "Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation." J Biol Chem **278**(17): 14599-602.
- Scott J. W., Hawley S. A., Green K. A., Anis M., Stewart G., Scullion G. A., Norman D. G. and Hardie D. G. (2004). "CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations." J Clin Invest **113**(2): 274-84.
- Shackelford S. D., Koohmaraie M., Wheeler T. L., Cundiff L. V. and Dikeman M. E. (1994). "Effect of biological type of cattle on the incidence of the dark, firm, and dry condition in the longissimus muscle." J Anim Sci **72**(2): 337-43.
- Shapiro M. B. and Senapathy P. (1987). "RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression." Nucleic Acids Res **15**(17): 7155-74.
- Shaw R. J., Kosmatka M., Bardeesy N., Hurley R. L., Witters L. A., DePinho R. A. and Cantley L. C. (2004). "The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3329-35.
- Shepherd P. R. and Kahn B. B. (1999). "Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus." N Engl J Med **341**(4): 248-57.
- 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**(1): 453-6.
- Smith C. and Bampton P. R. (1977). "Inheritance of reaction to halothane anaesthesia in pigs." Genet Res **29**(3): 287-92.

- Smith S. B. and Crouse J. D. (1984). "Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue." J. Nutr. **114**: 792-800.
- Soriguer F., Morcillo S., Cardona F., Rojo-Martinez G., de la Cruz Almaraz M., Ruiz de Adana Mde L., Oliveira G., Tinahones F. and Esteva I. (2006). "Pro12Ala polymorphism of the PPAR $\gamma$ 2 gene is associated with type 2 diabetes mellitus and peripheral insulin sensitivity in a population with a high intake of oleic acid." J Nutr **136**(9): 2325-30.
- Stapleton D., Mitchelhill K. I., Gao G., Widmer J., Michell B. J., Teh T., House C. M., Fernandez C. S., Cox T., Witters L. A. and Kemp B. E. (1996). "Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily." J Biol Chem **271**(2): 611-4.
- Stein S. C., Woods A., Jones N. A., Davison M. D. and Carling D. (2000). "The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation." Biochem J **345 Pt 3**: 437-43.
- Stephens T. J., Chen Z. P., Canny B. J., Michell B. J., Kemp B. E. and McConell G. K. (2002). "Progressive increase in human skeletal muscle AMPK $\alpha$ 2 activity and ACC phosphorylation during exercise." Am J Physiol Endocrinol Metab **282**(3): E688-94.
- Sundvold H., Brzozowska A. and Lien S. (1997). "Characterisation of bovine peroxisome proliferator-activated receptors gamma 1 and gamma 2: genetic mapping and differential expression of the two isoforms." Biochem Biophys Res Commun **239**(3): 857-61.
- Sutherland C. M., Hawley S. A., McCartney R. R., Leech A., Stark M. J., Schmidt M. C. and Hardie D. G. (2003). "Elm1p is one of three upstream kinases for the Saccharomyces cerevisiae SNF1 complex." Curr Biol **13**(15): 1299-305.
- Talmant A., Monin G., Briand M., Dadet M. and Briand Y. (1986). "Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles." Meat Sci. **18**: 23-40.
- Tanabe R., Muroya S. and Chikuni K. (1998). "Sequencing of the 2a, 2x, and slow isoforms of the bovine myosin heavy chain and the different expression among muscles." Mamm. Genome Res. **9**: 1056-1058.
- Thermann R., Neu-Yilik G., Deters A., Frede U., Wehr K., Hagemeyer C., Hentze M. W. and Kulozik A. E. (1998). "Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation." Embo J **17**(12): 3484-94.
- Thornton C., Snowden M. A. and Carling D. (1998). "Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle." J Biol Chem **273**(20): 12443-50.
- Touraille C., Monin G. and Legault C. (1989). "Eating quality of meat from european X chinese crossbred pigs." Meat Sci. **25**: 177-186.
- Valin C. (1988). "Différenciation du tissu musculaire. Conséquences technologiques pour la filière viande." Reprod. Nutr. Develop. **28**: 845-856.
- Valin C., Touraille C., Vigneron P. and Ashmore C. R. (1982). "Prediction of lamb meat quality traits based on muscle biopsy fibre typing." Meat Sci. **6**: 257-263.

- Vamecq J. and Latruffe N. (1999). "Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors." Lancet **354**(9173): 141-8.
- 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**(6960): 832-6.
- van Maanen M. H., Fournier P. A., Palmer T. N. and Abraham L. J. (1999). "Characterization of the human glycogenin-1 gene: identification of a muscle-specific regulatory domain." Gene **234**(2): 217-26.
- Vignal A., Milan D., SanCristobal M. and Eggen A. (2002). "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics." Genet. Sel. Evol. **34**: 275-305.
- Wang Q., Somwar R., Bilan P. J., Liu Z., Jin J., Woodgett J. R. and Klip A. (1999). "Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts." Mol Cell Biol **19**(6): 4008-18.
- White S. N., Taylor K. H., Abbey C. A., Gill C. A. and Womack J. E. (2003). "Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a positively selected ligand-binding domain." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(18): 10364-9.
- Winder W. W. (2001). "Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle." J Appl Physiol **91**(3): 1017-28.
- Winder W. W. and Hardie D. G. (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): E1-10.
- Wojtaszewski J. F., Jorgensen S. B., Hellsten Y., Hardie D. G. and Richter E. A. (2002). "Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle." Diabetes **51**(2): 284-92.
- Wojtaszewski J. F., Nielsen J. N., Jorgensen S. B., Frosig C., Birk J. B. and Richter E. A. (2003). "Transgenic models--a scientific tool to understand exercise-induced metabolism: the regulatory role of AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) in glucose transport and glycogen synthase activity in skeletal muscle." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1290-4.
- Wood J. D., Brown S. N., Nute G. R., Whittington F. M., Perry A. M., Johnson S. P. and Enser M. (1996). "Effects of breed, feed level and conditioning time on the tenderness of pork." Meat Sci. **44**: 105-112.
- Woods A., Dickerson K., Heath R., Hong S. P., Momcilovic M., Johnstone S. R., Carlson M. and Carling D. (2005). "Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." Cell Metab **2**(1): 21-33.

- Woods A., Johnstone S. R., Dickerson K., Leiper F. C., Fryer L. G., Neumann D., Schlattner U., Wallimann T., Carlson M. and Carling D. (2003). "LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade." Curr Biol **13**(22): 2004-8.
- Yamada E., Okada S., Saito T., Ohshima K., Sato M., Tsuchiya T., Uehara Y., Shimizu H. and Mori M. (2005). "Akt2 phosphorylates Synip to regulate docking and fusion of GLUT4-containing vesicles." J Cell Biol **168**(6): 921-8.
- Ylikorkala A., Rossi D. J., Korsisaari N., Luukko K., Alitalo K., Henkemeyer M. and Makela T. P. (2001). "Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice." Science **293**(5533): 1323-6.
- Yu H., Fujii N., Hirshman M. F., Pomerleau J. M. and Goodyear L. J. (2003). "Cloning and Characterization of Mouse 5'-AMP Activated Protein Kinase {gamma}3 Subunit." Am J Physiol Cell Physiol.
- Yu S. L., Kim J. E., Chung H. J., Jung K. C., Lee Y. J., Yoon D. H., Lee S. H., Choi I., Bottema C. D., Sang B. C. and Lee J. H. (2005). "Molecular cloning and characterization of bovine PRKAG3 gene: structure, expression and single nucleotide polymorphism detection." J Anim Breed Genet **122**(5): 294-301.
- Zamora F., Debiton E., Lepetit J., Lebert A., Dransfield E. and Ouali A. (1996). "Predicting variability of ageing and toughness in beef M. Longissimus lumborum et thoracis." Meat Sci. **43**: 321-333.
- Zeigerer A., McBrayer M. K. and McGraw T. E. (2004). "Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160." Mol Biol Cell **15**(10): 4406-15.
- Zhu Y., Qi C., Korenberg J. R., Chen X. N., Noya D., Rao M. S. and Reddy J. K. (1995). "Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7921-5.





## **Structure, expression et polymorphisme du gène *PRKAG3* bovin : implication dans le métabolisme musculaire et la qualité de la viande.**

Le gène *PRKAG3* code l'isoforme  $\gamma_3$  d'une sous-unité régulatrice de l'enzyme AMPK (AMP dependant Protein Kinase), cette kinase étant l'un des principaux médiateurs de la régulation du métabolisme des sucres et acides gras dans le muscle. Le gène *PRKAG3* bovin a été entièrement séquencé et sa structure établie. Nous avons mis en évidence une très grande variabilité au niveau de la séquence du gène et de la population de transcrits. 46 polymorphismes de type SNPs ont été identifiés, six d'entre eux entraînent un changement dans la séquence protéique. L'analyse des transcrits a montré l'existence de transcrits alternatifs générés par des mécanismes d'épissage jamais observés chez le porc ou dans d'autres espèces. Ces transcrits, correspondant à des formes plus longues de l'ARNm, sont retrouvés chez tous les animaux et présentent un taux de transcription plus faible que les transcrits standards de ce gène. Une étude préliminaire visant à explorer la variabilité phénotypique des caractéristiques des viandes en comparaison avec le génotype des animaux a montré que l'un des polymorphismes serait associé statistiquement avec le taux de glycogène. Nous avons également pu mettre en évidence que l'un des polymorphismes du gène *PRKAG3* est associé à une augmentation du taux de transcrits, suggérant une régulation de la transcription différente en fonction des allèles. Les 6 autres gènes codant les différentes isoformes des différentes sous-unités du complexe enzymatique ont également été caractérisés et leur polymorphisme étudié. Un taux beaucoup plus faible de polymorphisme a été détecté sur ces autres gènes, comparativement au nombre observé pour le gène *PRKAG3*. Une analyse quantitative des transcrits des différents gènes codant pour toutes les sous-unités de l'AMPK a été réalisée. Celle-ci nous a permis de confirmer que le transcrit du gène *PRKAG3* est préférentiellement exprimé dans le muscle squelettique, l'expression des transcrits des autres gènes étant plus ubiquitaire. La qualité d'une viande est également due à une composante lipidique dans le muscle. L'étude des transcrits du gène *PPARG* bovin a révélé l'existence d'un mécanisme complexe d'épissage intergénique, en plus des mécanismes habituels. Celui-ci conduit à deux types de transcrits chimères entre le gène *PPARG* et le gène voisin *TSEN2*. La présence d'une protéine chimère n'a pu être mise en évidence dans les tissus bovins, cependant cette protéine a pu être produite par expression transitoire dans des cellules de mammifère.

Mots clés : AMPK, *PRKAG3*, glycogène, muscle, *PPARG*, épissages intergéniques.