

# UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Thématique : Biologie, Santé

**Faculté des Sciences et Techniques**

Unité de Génétique Moléculaire Animale – UMR INRA 1061

N°11-2010

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Olivier Cocquempot

Le 31 Mars 2010

*Invalidation du gène Gasp1 et étude de sa fonction chez  
la souris.*

Directeur de thèse : Pr. Véronique Blanquet

Jury

Rapporteurs : Michel Duclos, Directeur de recherche, INRA Nouzilly

Jean-Luc Vilotte, Directeur de recherche, INRA Jouy en Josas

Examineurs : Elise Dargelos, Maître de conférences, Université Bordeaux 1

Abderrahman Maftah, Professeur, Université de Limoges

Véronique Blanquet, Professeur, Université de Limoges



# UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Thématique : Biologie, Santé

**Faculté des Sciences et Techniques**

Unité de Génétique Moléculaire Animale – UMR INRA 1061

N°11-2010

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Olivier Cocquempot

Le 31 Mars 2010

*Invalidation du gène Gasp1 et étude de sa fonction chez  
la souris.*

Directeur de thèse : Pr. Véronique Blanquet

Jury

Rapporteurs : Michel Duclos, Directeur de recherche, INRA Nouzilly

Jean-Luc Vilotte, Directeur de recherche, INRA Jouy en Josas

Examineurs : Elise Dargelos, Maître de conférences, Université Bordeaux 1

Abderrahman Maftah, Professeur, Université de Limoges

Véronique Blanquet, Professeur, Université de Limoges



*A mon grand-père*

*A mes parents*



## Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury de thèse, Abderrahman Maftah (président du jury), Michel Duclos et Jean-Luc Vilotte (rapporteurs) ainsi qu'Elise Dargelos (examineur) d'avoir évalué mes travaux de thèses.

Je remercie le Pr. Abderrahman Maftah et Hubert Leveziel de m'avoir accueilli au sein de l'UMR-INRA 1061 de Limoges.

Je souhaite remercier le Pr. Véronique Blanquet d'avoir été mon directeur de thèse, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et de m'avoir encadré durant ces trois ans.

Je remercie Laëtitia Magnol et Marie-Clémence Chevallier pour l'aide et les conseils qu'elles m'ont apportés.

Je remercie Lionel Forestier pour l'aide et le temps qu'il m'a accordés dans l'analyse de mes résultats. Ainsi que François Gallet pour le temps et l'aide qu'il m'a apportés lors des corrections de mon mémoire de thèse.

J'adresse tous mes remerciements à Karine Pasquier et Sylvie Desforges ainsi qu'aux autres personnes du service commun d'animalerie pour les soins apportés à nos souris.

Un grand merci à toute l'équipe de l'UMR-CNRS 6101 et plus particulièrement à Eric Pinaud qui m'y a accueilli pour effectuer quelques expériences.

Je remercie tous les membres de l'UMR-INRA 1061, statutaires, thésards ou étudiants, avec qui j'ai pu échanger tout au long de ma thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers mes parents qui m'ont toujours soutenu au cours de ces années et m'ont permis d'arriver là où je suis aujourd'hui.





# Publications et communications

## Publications

Cocquempot O., Brault V., Babinet C., Herault Y., 2009, “Fork stalling and template switching as a mechanism for polyalanine tract expansion affecting the *DYC* mutant of *HOXD13*, a new murine model of synpolydactyly”, *Genetics* 189: 23-30

Magnol L., Monestier O., Vuillier-Devilliers K., Wagner S., Cocquempot O., Chevallier MC., Blanquet V., “A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome : study of muscle characteristics”, *Mammalian Genome*, en soumission

## Communication orale

Cocquempot O., “Analyses fonctionnelles du gène *Gasp1* chez la souris et le bovin : implication dans le développement musculaire”, 10<sup>ème</sup> séminaire des thésards Département de Génétique Animale (INRA-Toulouse) les 20&21 mars 2008

## Communications écrites

Cocquempot O., Magnol L., Blanquet V., “Analyse fonctionnelle du gène *Gasp1* chez la souris : rôle au cours du développement musculaire”, 1<sup>ère</sup> journée scientifique de l'IFR GEIST (Limoges) le 28/09/07

Cocquempot O., “Invalidation du gène *Gasp1* et étude de sa fonction chez la souris et le bovin”, 9<sup>ème</sup> séminaire des thésards du Département de Génétique Animale (INRA-Jouy-en-Josas) les 25&26 avril 2007

Cocquempot O., Magnol L., Blanquet V., “Modélisation animale pour l'étude du développement musculaire”, Séminaire pluridisciplinaire de l'école doctorale 258 Science-Technologie-Santé de Limoges le 12/06/08

Cocquempot O., Magnol L., Blanquet V., “Analyse fonctionnelle du gène *Gasp1* chez la souris : rôle au cours du développement musculaire”, 2<sup>ème</sup> journée scientifique de l'IFR GEIST (Limoges) le 29/01/09



## **Abréviations**

**aa** : acide aminé

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ARNm** : ARN messenger

**bHLH** : basic Helix-Loop-Helix

**BMP** : Bone Morphogenetic Protein

**C2C12** : Lignée myoblastique murine

**Cdk** : Cyclin dependant kinase

**CMV** : Cytomégalovirus

**Co-Smad** : Co-mediator Smad

coll. : collaborateurs

**DEPC** : diéthyl pyrocarbonate

**DIG** : digoxigénine

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium

**dNTP** : Désoxynucléotide triphosphate

**dUTP** : désoxyuridine-triphosphate

**EDTA** : Ethylenediaminetetraacetic acid

**ES** : Embryonic stem (cell)

**FCS** : Foetal Calf Serum

**FGF** : Fibroblast Growth Factor

**FLRG** : follistatin related gene

**FS** : Follistatine

**Gasp1** : Growth and differentiation factor associated serum protein 1

**GDF** : Growth Differentiation Factor

**HGF** : Hepatocyte Growth Factor

**IGF** : Insulin-like Growth Factor

**I-Smad** : Inhibitory Smad

**KO** : Knock Out

**LB** : Luria Bertani

**Lbx1** : Ladybird homeobox homolog 1

**MEF2** : Myocyte Enhancer Factor 2

**MMTV** : Mouse Mammary Tumor Virus

**mh** : muscular hypertrophy

**MHC** : Myosin Heavy Chain

**Mox2** : Mesenchyme homeobox 2

**MRF4** : Muscle Regulatory Factor 4 (synonyme de Myf6)

**Myf** : Myogenic Factor

**MyoD** : Myoblast Determination gene

**Pax** : Paired box

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PCR-RFLP** : Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism

**PFA** : paraformaldéhyde

**PK** : protéinase K

**RT-PCR** : Reverse Transcription-PCR

**Shh** : Sonic Hedgehog

**Six** : Six oculis homeobox

**TGFβ** : Transforming Growth Factor β

**Wfikkn2** : WAP, follistatin/kasal, immunoglobulin kunitz and netrin containing protein 2  
Precursor

**Wnt** : Wingless-type MMTV integration site family member

## Résumé

La formation des muscles squelettiques est un processus complexe impliquant différentes étapes de différenciation, de prolifération, et de fusion ainsi que de nombreux facteurs moléculaires. Parmi ces derniers, la myostatine (Gdf8) est un régulateur négatif de la prolifération et de la différenciation des myoblastes, et l'absence d'une protéine fonctionnelle conduit à une remarquable augmentation de la masse musculaire. La myostatine, membre de la superfamille des TGF $\beta$ , est sécrétée sous la forme d'un précurseur. De nombreuses études sur la voie de signalisation de la myostatine ont permis de caractériser différents inhibiteurs de Gdf8 comme par exemple son propeptide ou la follistatine. Récemment, Gasp1 a été identifié comme nouveau partenaire de la myostatine, agissant comme un régulateur négatif de l'action de Gdf8. Afin de mieux connaître le rôle de Gasp1, en particulier au cours de la myogenèse, nous l'avons invalidé chez la souris par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires. L'établissement des souris knockout Gasp1<sup>-/-</sup> nous permet maintenant d'aborder les aspects fonctionnels du gène *Gasp1*. Des études préliminaires révèlent que les homozygotes sont viables et ne présentent pas de défauts de croissance. D'autre part, l'expression de *Gasp1* a été étudiée de manière spatio-temporelle au cours du développement embryonnaire grâce à des expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons murins *in toto* et quantifiée en PCR quantitative au cours de la prolifération et différenciation myogénique.

Mots-clés: Gasp1, myostatine, modèle animal, développement musculaire



## **Abstract**

Skeletal muscle formation is a complex process that involves the proliferation, alignment and fusion of myogenic precursor cells to form multinucleated myotubes that will subsequently mature into muscle fibers. A number of regulatory factors involved in these different steps have been identified. Among them, Myostatin (Gdf8), a member of TGF $\beta$  super-family is a negative regulator of myoblast proliferation and differentiation. The lack of a functional protein leads to remarkable muscle mass growth. Several Gdf8 inhibitors like the propeptide or the follistatin protein. Recently, Gasp1 was identified as a new myostatin partner, acting as a negative regulator of myostatin activity. To get more insights on Gasp1 functions, especially in myogenesis, we have used homologous recombination to effect the targeted disruption of the *Gasp-1* gene in mouse embryonic stem cells. *Gasp1*<sup>-/-</sup> knock-out mouse provides us an excellent tool to conduct functional studies. Preliminary analyses show the viability of homozygotes without growth defects. In parallel, *Gasp1* expression has been studied in spatio-temporal manner during embryogenesis by in situ hybridization on mouse embryo and quantified by quantitative PCR during myogenic proliferation and differentiation.

Key words: Gasp1, myostatin, animal model, muscular development





# Table des matières

<b>1</b>	<b>Contexte bibliographique .....</b>	<b>1</b>
1.1	Contexte au sein du laboratoire.....	1
1.2	Description du muscle squelettique.....	2
1.3	Formation du muscle squelettique et facteurs mis en jeu.....	4
1.3.1	Mise en place des fibres du muscle squelettique.....	7
1.3.2	Les facteurs intervenant au cours de la myogenèse .....	9
1.3.3	Les cellules musculaires.....	13
1.4	La myostatine (Gdf8) .....	16
1.4.1	Structure .....	16
1.4.2	Fonction au cours de la myogenèse.....	18
1.5	Le phénotype « culard » et la myostatine.....	21
1.5.1	Le phénotype « culard » .....	21
1.5.2	Les causes génétiques du phénotype « culard ».....	22
1.6	Gasp1.....	26
1.6.1	Structure .....	27
1.6.2	Expression .....	28
1.6.3	Interaction avec la myostatine.....	29
1.6.4	Gasp1, un inhibiteur de protéase ? .....	32
1.7	Projet de thèse .....	34
<b>2</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>35</b>
2.1	Biologie moléculaire .....	35
2.1.1	Réactions « standards » .....	35
2.1.2	Hybridation <i>in situ</i> .....	39
2.1.3	Extraction des ARN totaux .....	40
2.1.4	Vérification de la qualité des ARN (kit RNA 6000 Nano Assay, <i>Agilent</i> ).....	40
2.1.5	Transcription inverse (High Capacity cDNA Archive Kit, <i>Applied Biosystems</i> ).....	40
2.1.6	PCR quantitative en temps réel .....	41
2.2	Culture cellulaire.....	42
2.2.1	Culture de cellules souches embryonnaires (ES).....	42
2.2.2	Cultures de cellules myoblastiques C2C12.....	44
<b>3</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>47</b>
3.1	Etude des domaines d'expression de <i>Gasp1</i> par hybridation <i>in situ</i> sur embryon murin <i>in toto</i> .....	47
3.1.1	Mise au point d'une sonde ARN anti sens <i>Gasp1</i> .....	47
3.1.2	Domaine d'expression de <i>Gasp1</i> .....	47
3.1.3	Comparaison avec l'expression de <i>Gdf8</i> .....	49
3.2	Etude <i>in vitro</i> : Expression de <i>Gasp1</i> et des gènes myogéniques lors de la fusion et de la différenciation des myoblastes .....	50
3.2.1	Le modèle cellulaire C2C12.....	50

3.2.2	Caractérisation du modèle cellulaire C2C12.....	51
3.2.3	Etude de l'expression de <i>Gasp1</i> et <i>Gdf8</i> au sein de ce modèle.....	54
3.2.4	Conséquences de la surexpression de <i>Gasp1</i> .....	54
3.3	Etude <i>in vivo</i> : Réalisation d'un modèle murin <i>Gasp1</i> KO.....	60
3.3.1	Construction du vecteur de ciblage .....	61
3.3.2	Recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (ES) ....	63
3.3.3	Injection des cellules ES <i>Gasp1</i> KO dans des blastocystes .....	65
<b>4</b>	<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>67</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>75</b>

## Liste des figures

Figure 1	: Structure du muscle squelettique.....	3
Figure 2	: Représentation schématique de la somitogenèse.....	4
Figure 3	: Diagramme présentant les processus de compartimentation et de signalisation des somites.....	5
Figure 4	: Représentation schématique des phases de migration et de différenciation des myoblastes.....	7
Figure 5	: Myogenèse primaire et secondaire chez le poulet .....	8
Figure 6	: Voies de signalisation de l'induction myogénique.....	9
Figure 7	: Action de Six1 et Six4 au cours de la myogenèse.....	10
Figure 8	: Signaux contrôlant la migration et la différenciation des précurseurs musculaires du membre.....	12
Figure 9	: Modèle de la fonction de Shh pendant le développement embryonnaire des myoblastes au niveau hypaxial.....	14
Figure 10	: Myogenèse chez l'adulte .....	15
Figure 11	: Structure de la protéine myostatine .....	18
Figure 12	: Voie de signalisation de la myostatine .....	19
Figure 13	: Rôle de la myostatine dans la croissance musculaire .....	20
Figure 14	: Mutations bovines de <i>GDF8</i> .....	24
Figure 15	: Phénotype d'hypermusculature chez le bovin, la souris et l'homme .....	25
Figure 16	: Schéma du gène <i>Gasp1</i> .....	27
Figure 17	: Schéma des domaines de la protéine Gasp1 .....	27
Figure 18	: Arbre phylogénétique des protéines Gasp1 et Gasp2 prédites à partir des séquences génomiques humaine et murine .....	28
Figure 19	: Expression de <i>Gasp1</i> dans différents tissus et au cours du développement embryonnaire.....	28
Figure 20	: Interaction entre Gasp1, la myostatine et le propeptide de la myostatine .....	29
Figure 21	: Inhibition de l'activité A) de la myostatine B) de BMP11 C) de l'activine et D) du TGFβ1 en fonction de la quantité de Gasp1 .....	30
Figure 22	: Courbe d'inhibition de la myostatine par Gasp1 .....	31
Figure 23	: Sonde ARN anti-sens <i>Gasp1</i> testées.....	47
Figure 24	: Domaines d'expression de <i>Gasp1</i> de 9,5 à 12,5 jpc .....	48
Figure 25	: Domaines d'expression de <i>Gasp1</i> au niveau des membres, à 11,5 et 12,5 jpc .....	48

Figure 26 : Domaine d'expression de <i>Gdf8</i> de 9,5 jpc à 12,5 jpc .....	49
Figure 27 : Domaines d'expressions de <i>Gasp1</i> en fonction du génotype de <i>Gdf8</i> .....	50
Figure 28 : Courbe de fusion des C2C12 .....	51
Figure 29 : Photographie des cellules C2C12 à différents stades de fusion .....	52
Figure 30 : Expression de la <i>Myogénine</i> lors de la prolifération et de la fusion des C2C12 ...	52
Figure 31 : Expression de <i>MyoD</i> , <i>Myf5</i> , <i>MRF4</i> , <i>Pax3</i> et <i>Pax7</i> lors de la prolifération et de la fusion des C2C12 .....	53
Figure 32 : Expression de <i>Gasp1</i> et <i>Gdf8</i> lors de la prolifération et de la fusion des C2C12..	54
Figure 33 : Effet de la surexpression de <i>Gasp1</i> sur la fusion des myoblastes en myotubes....	55
Figure 34 : Photographie des cellules C2C12 à différents stades de fusion, pour les lignées SurGasp, Contrôle et non transfectée .....	56
Figure 35: Expression de <i>Gasp1</i> (A) et <i>Gdf8</i> (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp....	57
Figure 36: Expression de la <i>Myogénine</i> (A) et de <i>MyoD</i> (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp .....	58
Figure 37: Expression de <i>Myf5</i> (A) et <i>MRF4</i> (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp....	59
Figure 38: Expression de <i>Pax3</i> (A) et <i>Pax7</i> (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp .....	60
Figure 39 : Stratégie de la réalisation du KO de <i>Gasp1</i> .....	61
Figure 40 : Vérification de l'intégration de Néo dans pTKGASP.....	62
Figure 41 : Recombinaison homologue et crible des cellules ES résistantes.....	63
Figure 42 : Crible des clones ES par Southern blot avec la sonde <i>Gasp 3'</i> .....	64
Figure 43 : Vérification par Southern blot de la recombinaison homologue du clone recombinant en 5' et en 3' .....	65
Figure 44 : Schéma des fragments amplifiés lors du génotypage des souris de la lignée <i>Gasp1</i> KO.....	66
Figure 45 : Génotypage des souris agoutis.....	66

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Détails des amorces utilisées.....	36
Tableau 2 : Liste des vecteurs TOPO® utilisés .....	37
Tableau 3: Liste des vecteurs utilisés pour les différentes étapes de la création du vecteur de recombinaison pKO1.....	37
Tableau 4 : Sondes TaqMan® utilisées pour l'étude de l'expression des gènes de la myogenèse au cours des étapes de prolifération et de différenciation des cellules C2C12 .....	41
Tableau 5 : Résumé des différentes électroporations.....	65



# 1 Contexte bibliographique

## 1.1 Contexte au sein du laboratoire

L'Unité de Génétique Moléculaire Animale appartient au Département de Génétique Animale de l'INRA. Il a pour objectif d'une part la compréhension du déterminisme génétique des caractères phénotypiques observés chez les animaux domestiques et de façon plus générale, l'apport de connaissances en biologie intégrative. D'autre part il développe aussi des moyens d'amélioration et de conservation génétique des populations d'animaux d'élevage.

Parmi ces objectifs, l'Unité de Génétique Moléculaire Animale de Limoges contribue à l'acquisition des connaissances en génomique bovine et dans le déterminisme génétique de caractères d'intérêt chez les bovins allaitants. Deux aspects sont développés en ce sens : un premier aspect porte sur l'acquisition de connaissances relatives aux gènes de la glycosylation, et sur les gènes intervenant dans le déterminisme des caractéristiques musculaires et de la coloration de la robe. Le second aspect consiste au développement d'outils moléculaires permettant la traçabilité, la sécurité et la qualité des produits carnés mais aussi l'identification et la sélection des animaux les plus performants pour l'industrie agro-alimentaire. Plus particulièrement, l'étude du déterminisme génétique du développement musculaire a pour but d'appréhender la variabilité de masse musculaire chez les bovins, et de conduire à la sélection d'animaux possédant de meilleures performances agronomiques. La compréhension de la myogenèse représente un intérêt agronomique et économique pour les races bovines dites « à viande » par l'obtention d'animaux qui possédant un développement musculaire plus important. Elle présente également un intérêt en médecine humaine car elle permettrait de développer des thérapeutiques pour les pathologies touchant les muscles squelettiques tels que les dystrophies et les myopathies.

C'est dans ce contexte d'étude des gènes impliqués dans le développement musculaire que j'ai effectué mes travaux de thèse. La recherche des gènes impliqués dans le développement musculaire chez le bovin fait appel à des programmes basés sur le croisement d'animaux sélectionnés sur le phénotype et l'étude de leur descendance. Ces programmes nécessitent d'importants investissements financiers sur une longue période. De plus, ils ne permettent d'obtenir que de larges QTL (Quantitative Trait Loci) et très rarement l'isolement du gène impliqué dans le développement musculaire. L'identification des gènes orthologues et la

conservation des génomes (séquences et fonctions) entre les espèces permettent d'envisager des études phénotypiques et fonctionnelles sur un gène d'intérêt dans une espèce modèle comme la souris, organisme modèle de référence des mammifères.

Afin de mieux comprendre le déterminisme génétique de l'hypermusculature chez le bovin, l'équipe a mis au point différentes stratégies chez la souris pour l'étude d'anomalies conduisant à un fort développement musculaire. Dans ce but, deux approches ont été mises en place : la première est une approche de génétique classique portant sur le criblage phénotypique d'animaux porteurs de mutations aléatoires. La mutation causale du phénotype musculaire observé, sera identifiée par une étape de cartographie génétique. Cette approche permet d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le développement musculaire ou de nouvelles fonctions pour des gènes déjà connus. La deuxième approche fait appel à la génétique inverse, elle permet d'identifier et d'analyser, *in vivo*, la fonction de gènes qui n'est pas encore connue. Cette analyse fonctionnelle est effectuée grâce à l'étude des phénotypes de lignées murines ayant subi une transgénèse additive ou une recombinaison homologe. Ces approches utilisent le modèle murin afin d'acquérir de nouvelles connaissances qui pourront être transposées chez le bovin.

Mon projet de thèse, basé sur la deuxième approche a consisté en l'analyse fonctionnelle du gène *Gasp1* (Hill *et al.*, 2003), dont la protéine est connue pour être un inhibiteur de la myostatine (élément clé de la myogenèse) et de son propeptide. Cette analyse est réalisée après l'établissement d'une lignée murine dont *Gasp1* a été invalidé par recombinaison homologe.

## **1.2 Description du muscle squelettique**

Trois grands types de muscle sont observés chez les vertébrés : le muscle cardiaque, le muscle lisse et le muscle squelettique. Ces différents types de fibres possèdent des caractéristiques à la fois structurales et fonctionnelles qui leur sont propres. Les travaux de cette thèse portant sur le muscle squelettique, il sera le seul à être décrit.

Le muscle squelettique est délimité par l'épimysium qui regroupe un ensemble de faisceaux musculaires ainsi que des vaisseaux sanguins ; les faisceaux musculaires sont délimités par le périmysium et regroupent les fibres musculaires, elles mêmes entourées par l'endomysium (Figure 1). Il se compose de différents types de fibres qui expriment chacune une forme de chaîne lourde de myosine (MyHC). Les fibres rapides expriment une des formes rapides de

MyHC et possèdent une grande force. Elles se subdivisent en trois groupes : les petites fibres de type IIA qui possèdent un métabolisme oxydatif rapide, les intermédiaires de type IIX et celles de type IIB qui utilisent la glycolyse rapide. Ces dernières montrent la vitesse de contraction la plus importante, cependant cette glycolyse a pour conséquence une fatigue qui survient plus tôt. Mais également les fibres lentes qui expriment l'isoforme à contraction lente de MyHC. Elles possèdent un métabolisme oxydatif, et peuvent maintenir une longue contraction sans fatigue (Hughes et Salinas, 1999).

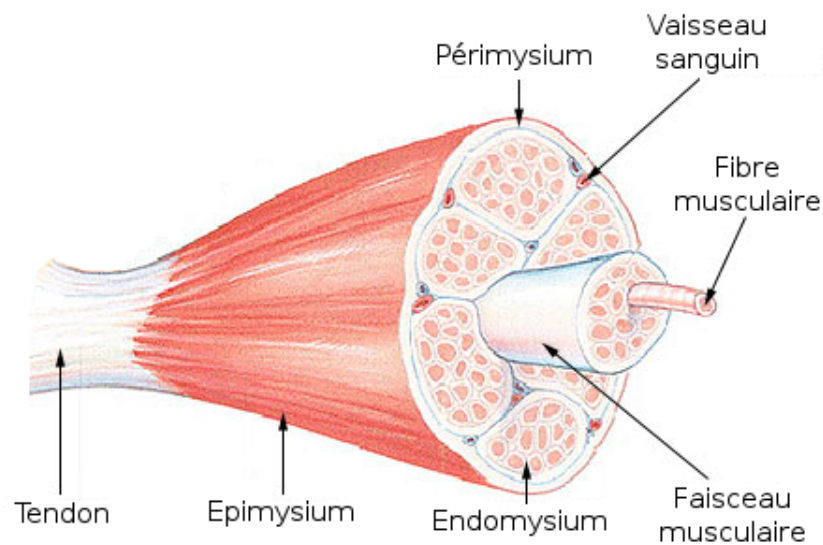


Figure 1 : Structure du muscle squelettique (d'après <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/muscular/structure.html>). Les fibres musculaires entourées par l'endomysium sont regroupées en faisceau grâce au péri-mysium. L'ensemble des faisceaux regroupés dans l'épimysium forme le muscle.

Les cellules satellites sont aussi un élément qui compose le muscle squelettique. En cas de lésion du muscle, elles se divisent et se différencient pour former de nouvelles fibres. Elles ont pour origine le muscle, l'endothélium ou la moelle osseuse ; de plus elles expriment des marqueurs endothéliaux (Beauchamp *et al.*, 2000). Les cellules satellites ont une capacité de renouvellement limitée ; si les conditions sont pathologiques comme dans les myopathies, il se produit une dégénérescence musculaire. Cependant des progéniteurs musculaires, sous forme de cellules souches, contenus dans la moelle osseuse présentent un intérêt pour le traitement des myopathies (Ferrari *et al.*, 1998). Le muscle adulte aussi contient des cellules souches qui peuvent contribuer à la formation de muscle ou de sang (Gussoni *et al.*, 1999).







Figure 3 : Diagramme présentant les processus de compartimentation et de signalisation des somites (d'après Brand-Saberi *et al.*, 1996)

Le dermomyotome donne naissance aux cellules musculaires grâce aux signaux transmis par l'ectoderme et les tissus environnants (Schmidt *et al.*, 1998 ; 2001). Il donne dans sa partie médiane le muscle épiaxial et le derme du dos, dans sa partie latérale le muscle hypaxial. La limite entre les deux lignées myogéniques divise le somite épithélial en deux parties : médiane et latérale (Ordahl et Le Douarin, 1992). Durant la croissance du bord du dermomyotome les cellules précurseurs du muscle épiaxial migrent vers le myotome auquel elles sont additionnées en couches successives (Denetclaw *et al.*, 1997 ; Ordahl *et al.*, 2001).

La myogenèse au niveau épiaxial requiert des signaux provenant de la structure axiale tels que ceux de gènes membres de la famille *Wnt* qui sont exprimés dans le tube neural (Ikeya et Takada, 1998). Ces signaux sont indispensables pour démarrer et maintenir l'expression de *MyoD* (membre de la famille des MRF) dans le myotome épiaxial (Pownall *et al.*, 1996 ; Dietrich *et al.*, 1997 ; Münsterberg et Lassar, 1995 ; Stern *et al.*, 1995 ; Buffinger et Stockdale, 1994). Le muscle hypaxial a pour origine la partie latérale du dermomyotome, qui est située entre les membres et qui forme le myotome hypaxial. Ces derniers donnent naissance aux muscles thoraciques et abdominaux. Au niveau des membres, le dermomyotome latéral se désintègre en relâchant des progéniteurs musculaires qui migrent et envahissent le bourgeon du membre où ils continuent à proliférer. Après cette phase de prolifération, ils se différencient en progéniteur musculaire (Brand-Saberi et Christ, 1999).

Les muscles des membres sont formés par les cellules provenant des somites, présentes dans les bourgeons des membres. Le dermomyotome épiaxial qui est proche du tube neural et de la notochorde forme les muscles profonds du dos alors que le reste des muscles du corps et des membres dérive de l'extrémité hypaxial. La première masse musculaire qui se forme est le myotome, qui donnera la musculature du tronc. Pour les bourgeons des membres, les cellules progénitrices des muscles se délaminent à partir de l'épithélium du dermomyotome hypaxial et migrent dans les membres en position dorsale et ventrale où se forment les masses musculaires initiales. Ce sont les cellules du mésenchyme qui donnent le signal de positionnement de ces progéniteurs musculaires venant des somites. Après la délamination, les cellules pré-myogéniques migrent le long d'un réseau fibrillaire. La migration est dépendante de protéines membranaires, N-cadherine et integrine, et de composants de la matrice extracellulaire, la fibronectine et l'hyaluronane (Figure 4) (Jaffredo *et al.*, 1988 ; Brand-Saberi *et al.*, 1996; Swartz *et al.*, 2001).

Le programme de différenciation myogénique, qui est marqué par l'expression des MRF (*MyoD*, *Myogénine*, *Myf5* et *MRF4*), se déroule après la migration des précurseurs myogéniques mais avant leur ségrégation en masse dorsale et ventrale.

Différents gènes et familles de gènes tels que les *Pax* (paired box gene), les *MRF* (Myogenic Regulation Factor) ou les *FGF* (Fibroblast Growth Factor) sont impliqués au cours des différentes étapes de la myogenèse du muscle squelettique (Tableau 1). Ces gènes sont hiérarchisés de par le lieu et le moment de leur expression au cours de la myogenèse.

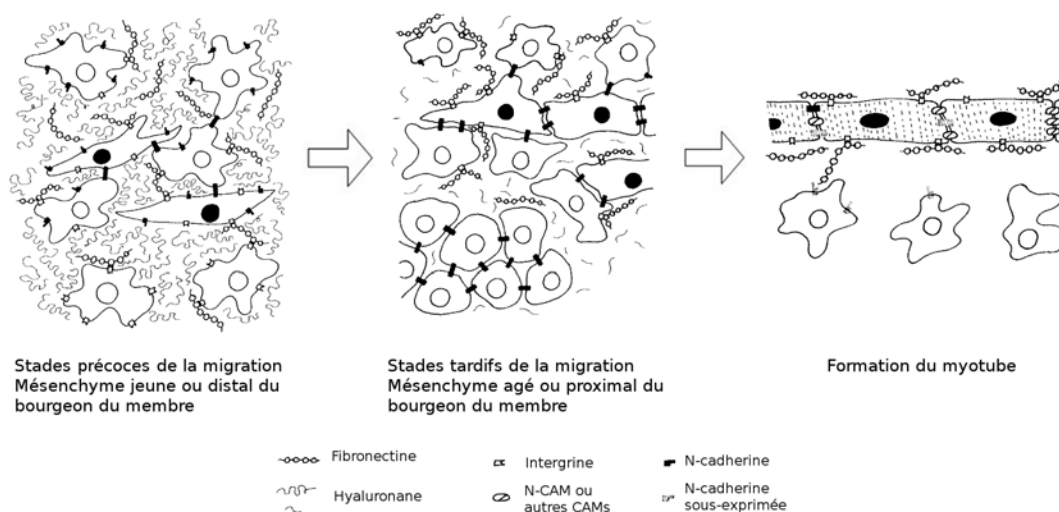


Figure 4 : Représentation schématique des phases de migration et de différenciation des myoblastes en considérant les molécules d'adhésion et la matrice extracellulaire (d'après Brand-Saberi *et al.*, 1996). Au stade précoce de la migration, les cellules sont séparées par une matrice extracellulaire hautement hydratée comprenant du hyaluronane et d'autres glycosaminoglycanes, protéoglycanes et glycoprotéines. Les contacts entre les cellules stationnaires et les myoblastes ainsi que ceux entre les myoblastes sont restreints aux sites « focaux » transitoires. Plus tardivement, le hyaluronane est réduit dans l'espace intercellulaire, ce qui permet aux cellules d'établir des contacts via les molécules d'adhésion cellulaire. Ces contacts peuvent entraîner la différenciation musculaire avec l'influence d'autres facteurs. La fusion se produit seulement entre deux myoblastes car les molécules d'adhésion cellulaire (N-CAM et M-cadhérine) qui stabilisent la fusion ne sont exprimées qu'au niveau des myoblastes. La fibronectine stabilise les myotubes nouvellement formés, la N-cadhérine étant sous-exprimée.

### 1.3.1 Mise en place des fibres du muscle squelettique

Les fibres des muscles squelettiques sont formées par deux vagues de fusion successives : les fibres primaires agissent comme un échafaudage pour les fibres secondaires (Figure 5). Il

existe un motif spécifique des fibres rapides et des fibres lentes pour chaque muscle, qui semble être intrinsèque aux myoblastes (Nikovits *et al.*, 2001 ; Miller et Stockdale, 1986). Cet arrangement de fibres diffère aussi sur l'axe proximo-distal, soulevant la question de savoir comment il est spécifié (Zhang et McLennan, 1998). Il peut être modulé par l'innervation, les hormones et les facteurs de croissances (Blagden et Hughes, 1999).

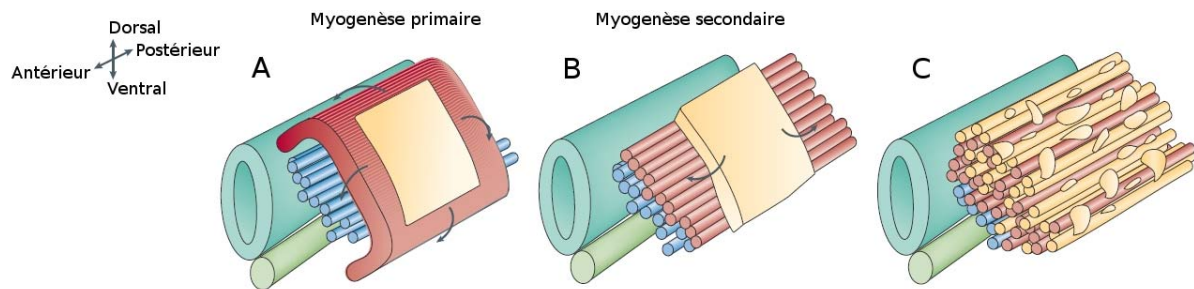


Figure 5 : Myogenèse primaire et secondaire chez le poulet (d'après Bryson-Richardson *et al.*, 2008). A) Les fibres précoces qui se forment sont les « fibres primaires » (en bleu). Elles dérivent du somite médio-dorsal (Kahane *et al.*, 1998) et occupent la position ventrale du dermomyotome (en rouge). B) Le myotome primaire se forme grâce à la délamination des cellules des quatre bords épithéliaux du dermomyotome. C) La structure de la région centrale du dermomyotome (en jaune) se dé-épithélialise pendant la seconde phase myogénique, contribuant ainsi à la seconde vague de formation du muscle.

### Les fibres primaires et secondaires

Les fibres primaires se forment au cours du développement embryonnaire et se déposent au niveau du site des futurs muscles. La quantité de masse musculaire formée par les myoblastes primaires est très réduite. Leur rôle est de définir le type, la forme et la position du muscle. Les fibres primaires traversent le muscle de tendon à tendon et sont innervées en de multiples plaques avant la formation des fibres secondaires (Duxson et Usson, 1989 ; Duxson et Sheard, 1995). Les fibres secondaires se forment et s'insèrent à la surface des fibres primaires près des sites d'innervations. Initialement, elles ne traversent pas le muscle sur sa longueur totale. Elles augmentent rapidement en nombre et en nucléation, séparément des fibres primaires.

### 1.3.2 Les facteurs intervenant au cours de la myogenèse

De nombreux facteurs interviennent lors de la formation des fibres musculaires. Les principaux constituent la famille des MRF (Myogenic Regulation Factor) qui appartiennent à la famille de facteurs de transcription bHLH (hélice-boucle-hélice basique) et regroupent *Myf5*, *MyoD*, *Myogénine*, *MRF4* (*Myf6*) (Figure 6). Ils sont exprimés dans les précurseurs myogéniques et sont essentiels pour la détermination et la différenciation des cellules musculaires (Ott *et al.*, 1991 ; Pownall et Emerson, 1992 ; Sassoonn, 1993).

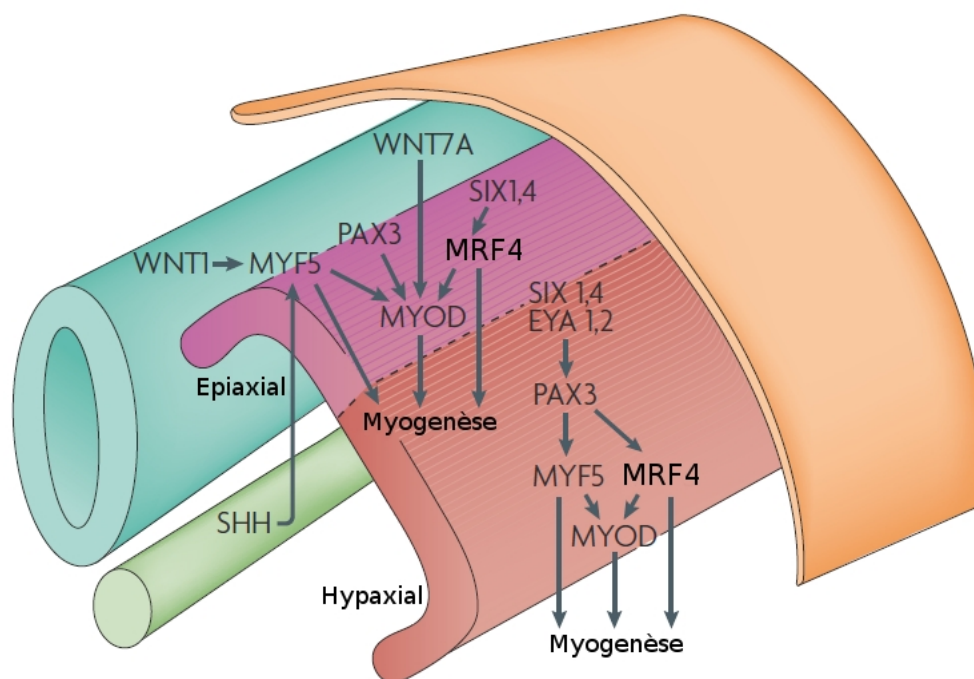


Figure 6 : Voies de signalisation de l'induction myogénique (d'après Bryson-Richardson *et al.*, 2008). Dans le dermomyotome épiauxial, Pax3, Myf5 et MFR4 peuvent induire indépendamment l'expression de MyoD. Alors que dans le dermomyotome hypaxial Pax3 induit directement l'expression de Myf5 et MRF4 qui vont activer l'expression de MyoD. Le signal Wnt1 du tube neural induit la myogenèse par l'activation directe de Myf5, alors que Wnt7a active préférentiellement MyoD. Shh régule aussi la myogenèse en maintenant l'expression de Myf5. Six1 et Six4 régulent MRF4 dans le dermomyotome épiauxial, et induisent l'expression de Pax3 dans le dermomyotome hypaxial avec les cofacteurs Eya1 et Eya2.

La régulation de ces gènes en amont de la myogenèse fait appel à un ensemble de gènes parmi lesquels Sonic hedgehog (Shh) qui permet le maintien des précurseurs musculaires dans un état indifférencié et prolifératif (Amthor *et al.*, 1998 ; Krüger *et al.*, 2001). Il intervient dans la

régulation de *Pax3* (Duprez *et al.*, 1998 ; Bren-Mattison et Olwin, 2002). Il régule aussi l'expression de facteurs de transcription tel que *MyoD* (Münsterberg *et al.*, 1995 ; Chiang *et al.*, 1996 ; Borycky *et al.*, 1999 ; Krüger *et al.*, 2001 ; Bren-Mattison et Olwin, 2002). La famille de gènes à homéodomaine *Six* prend également part dans cette régulation en agissant sur l'expression de *MRF4* mais aussi des *Pax* (Spitz *et al.*, 1998 ; Relaix et Buckingham, 1999 ; Griffone *et al.*, 2005, 2007 ; Giordani *et al.*, 2007) (Figure 7).

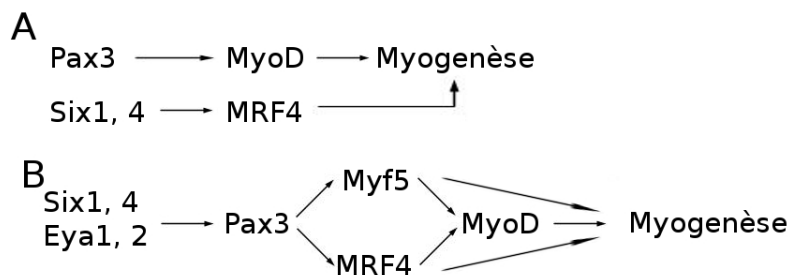


Figure 7 : Action de Six1 et Six4 au cours de la myogenèse (d'après Bryson-Richardson et al., 2008). A) Activation parallèle de la myogenèse entre Pax3 et Six1, 4. Pax3 active la myogenèse par l'intermédiaire de MyoD alors qu'en parallèle Six1 et Six4 l'activent par MRF4. B) Régulation de Pax3 par Six1, 4. Six1, Six4 et leur cofacteur Eya1 et Eya2 régulent Pax3 en amont des MRF lors de la myogenèse.

*Pax3* qui est un facteur de transcription permet le maintien des myoblastes dans un état prolifératif (Amthor *et al.*, 1998). Il peut activer l'expression des MRF (Tajbakhsh *et al.*, 1997 ; Maroto *et al.*, 1997 ; Heanue *et al.*, 1999). Cependant il n'est pas essentiel pour la différenciation myogénique (Daston *et al.*, 1996). Les Wnt (wingless-related MMTV integration site) activent aussi l'expression des MRF et induisent la dorsalisation du membre (Tajbakhsh *et al.*, 1998 ; Parr et MacMahon, 1995 ; Riddle *et al.*, 1995). L'interruption de leur voie de signalisation entraîne une modification de la survie, de la prolifération et de la différenciation des myoblastes (Borello *et al.*, 1999 ; Terry *et al.*, 2000 ; Ladher *et al.*, 2000).

Lorsque les myoblastes atteignent les bourgeons des membres, ils n'expriment plus *Pax3* mais les *MRF* (Bober *et al.*, 1994 ; Tajbakhsh et Buckingham, 1994 ; Gross *et al.*, 2000 ; Uchiyama *et al.*, 2000). Ils sont exprimés de façon séquentielle, *Myf5* puis *MyoD* marquent le début de la myogenèse. La voie de signalisation de Notch contrôle la transition de *Myf5* à

*MyoD* dans la myogenèse en provoquant la sous-expression de *MyoD* lors de son activation (Delfini *et al.*, 2000; Hirsinger *et al.*, 2001). La *Myogénine* est ensuite exprimée et finalement *MRF4* s'exprime dans les fibres musculaires différenciées (Tajbakhsh *et al.*, 1997 ; Delfini *et al.*, 2000 ; Rudnicki *et al.*, 1993 ; Tajbakhsh *et al.*, 1997 ; Valdez *et al.*, 2000). *Myf5* et *MyoD* sont essentiels pour la détermination des précurseurs cellulaires en myoblastes, de plus ils présentent une compensation de leur fonction (Tajbakhsh *et al.*, 1996 ; Kablar *et al.*, 1999 ; Braun *et al.*, 1992 ; Rudnicki *et al.*, 1992). La *Myogénine* montre un rôle essentiel pour la différenciation terminale des myoblastes lors de la mise en place des muscles au cours du développement (Hasty *et al.*, 1993 ; Nabeshima *et al.*, 1993 ; Knap *et al.*, 2006)

Des gènes interagissent avec les MRF au cours de la myogenèse, notamment les FGF (Fibroblast Growth Factor) qui permettent la prolifération des myoblastes et leur migration dans les membres (Edom-Vovard *et al.*, 2001 ; Webb *et al.*, 1997). Ils inhibent aussi leur différenciation au niveau de l'extrémité distale du membre. cependant lors de cette dernière ils doivent être sous exprimé (Robson et Hughes, 1996 ; Itoh *et al.*, 1996). Cette interaction se fait au travers d'une boucle de régulation entre le récepteur 4 des FGF (Freck), *Myf5* et *MyoD* (Marics *et al.*, 2002 ; Delfini *et al.*, 2004). Les BMP (Bone Morphogenic Protein), un sous-groupe de la famille des TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) interagissent aussi avec les MRF. Ils répriment le développement musculaire en inhibant *Pax3* et *MyoD* (Amthor *et al.*, 1998, 1999 ; Pourquoié *et al.*, 1996 ; Reshef *et al.*, 1998) (Figure 8). La levée de cette inhibition, en particulier par l'inactivation de la myostatine (*Gdf8* ou *Bmp8*), induit un phénotype d'hypermuscularité, dont le phénotype « culard » chez le bovin (Grobet *et al.*, 1997 ; Kambadur *et al.*, 1997 ; McPherron et Lee, 1997). De plus, la transduction du signal de SF/HGF (Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor) par son récepteur c-met permet la conservation des précurseurs musculaires dans un état indifférencié et prolifératif par l'inhibition de *MyoD* (Scaal *et al.*, 1999).

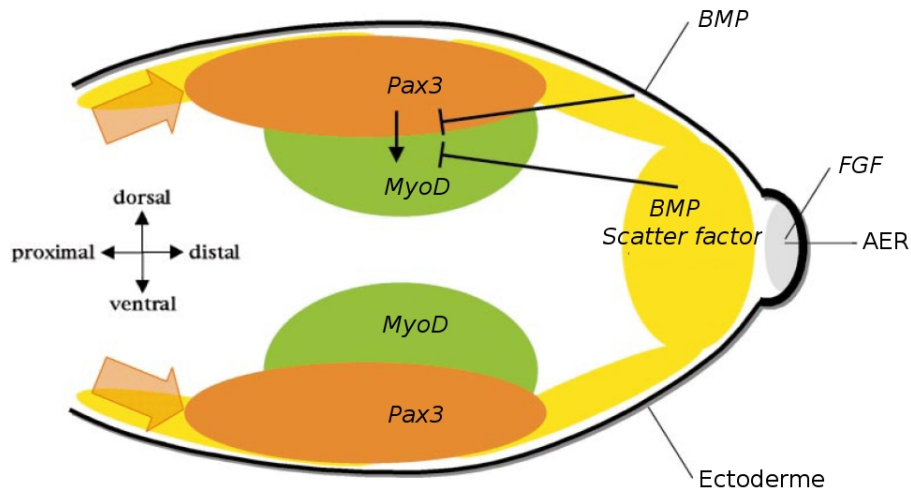


Figure 8 : Signaux contrôlant la migration et la différenciation des précurseurs musculaires du membre (d'après Francis-West et al., 2003). Les cellules prémyogéniques exprimant *Pax3* (en orange) migrent vers l'AER (Apical Ectodermal Ridge ; en gris), qui exprime les FGF et régule l'expression de *scatter factor* dans le mésenchyme sous-jacent (en jaune). Une fois dans le bourgeon du membre, les cellules prémyogéniques commencent à se différencier et à exprimer les gènes de la régulation myogénique, *Myf5* et *MyoD* (en vert). Les cellules myogéniques se trouvent au centre du bourgeon du membre alors que les cellules en prolifération et exprimant *Pax3* sont proches de l'ectoderme. Les signaux BMP, issus de l'ectoderme et du mésenchyme, avec *scatter factor* dans le mésenchyme et FGF dans l'AER répriment la différenciation myogénique.

La différence entre les types de fibres se situe au niveau de l'expression des chaînes lourdes de myosine (MyHC) et de leur activité métabolique.

Dans l'embryon, les fibres lentes et rapides sont assemblées avant l'innervation ou l'influence hormonale et doivent être spécifiées par différentes molécules ou interactions cellulaires. Les cellules des membres, isolées en culture semblent biaisées ou prédisposées à être lentes ou rapides, ce qui indique une population hétérogène (Miller et Stockdale, 1986 ; Stockdale, 1990 ; DiMario *et al.*, 1993, DiMario et Stockdale, 1995 ; Pin et Merrifield, 1997). Les propriétés distinctes entre fibres lentes et rapides peuvent être héritées de générations successives (Robson et Hughes, 1999).

Les premiers myoblastes entrant dans le membre formeraient les fibres lentes. Ils acquièrent leur détermination dans les somites ou pendant la migration, ils sont donc prédéterminés (Van Swearingen et Lance-Jones, 1995). Cependant des expériences de greffes de muscles, de cellules satellites ou foetales sont en faveur d'une détermination du type de fibre par l'environnement (Nikovits *et al.*, 2001 ; Hughes et Blau, 1992 ; DiMario et Stockdale, 1997 ; Robson et Hughes, 1999).



Les variations entre les études proviennent des populations analysées, les myoblastes embryonnaires donnent les myotubes primaires et les myoblastes fœtaux donnent les myotubes secondaires. Ces derniers participent aussi à la croissance des fibres primaires et des cellules satellites (Seed et Hauschka, 1984 ; Evans *et al.*, 1994). Les cellules peuvent avoir un devenir biaisé à la sortie des somites car ce devenir peut être supplanté par l'environnement, le déterminisme entre fibre lente et fibre rapide se produit alors dans le bourgeon du membre (Kardon *et al.*, 2002). Cette plasticité est visible chez le poisson zèbre *u-boot* qui en absence de *Shh* ne peut pas former de fibres lentes alors que sa surexpression ne donne que ce type de fibre qui pourront par la suite devenir des fibres rapides (Roy *et al.*, 2001).

Le patron des muscles est lié à la structure du squelette (Robson *et al.*, 1994), si cette structure est modifiée la musculature s'accorde au nouveau squelette (Parr et McMahon, 1995). Au niveau moléculaire, la localisation spatiale des muscles est liée à l'expression différentielle de *Hoxa13* dans les masses pré musculaires (Yamamoto *et al.*, 1998). Des expériences de KO indiquent que le développement de chaque muscle dépend d'une combinaison spécifique de facteurs tels que les gènes *Lbx1* et *Mox2* (Mankoo *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Les cellules musculaires

#### Les fibres rapides

Dans les fibres rapides et intermédiaires (IIB et IIX), *MyoD* est fortement exprimé (Hughes *et al.*, 1997). Le KO de *MyoD* conduit à une absence des fibres de type IIA et I ainsi qu'à une quantité moindre de fibres de type IIB dans les muscles rapides (Hughes *et al.*, 1997). La fraction de fibres rapides qui expriment normalement *MyoD* acquiert alors des caractéristiques de fibres lentes, l'activité catalase qui est plus importante dans ces fibres augmente. Pour les muscles lents, une perte des fibres lentes ainsi qu'une augmentation des rapides de type IIA et IIX sont observées.

La *Myogénine* contrôle le fibrotype, l'augmentation de son expression provoque le changement du métabolisme glycolytique en métabolisme oxydatif, ce changement ne s'accompagne pas du changement d'expression de MyHC (Hughes *et al.*, 1999).

## Les fibres lentes

Dans les fibres lentes (de type I) *MyoD* est exprimé à un faible niveau (Hughes *et al.*, 1997).

*Shh* ou *hedgehog* permettent la formation de fibres lentes (Currie et Ingham, 1996 ; Blagden *et al.*, 1997 ; Du *et al.*, 1997 ; Cann *et al.*, 1999 ; Lewis *et al.*, 1999 ; Barresi *et al.*, 2000). *Shh* réprime la différenciation des myoblastes postérieurs dans la masse musculaire ventrale, autorisant les mitogènes présents dans le mésenchyme du bourgeon du membre à stimuler leur prolifération. Au contraire l'absence de *Shh* induit une différenciation précoce destinée à exprimer des MyHC lentes. La différenciation précoce diminue le pool de myoblastes en prolifération, le résultat *in fine* est une diminution de la masse musculaire, à cause de la perte de fibres à MyHC lentes (Figure 9) (Bren-Mattison et Olwin, 2002).

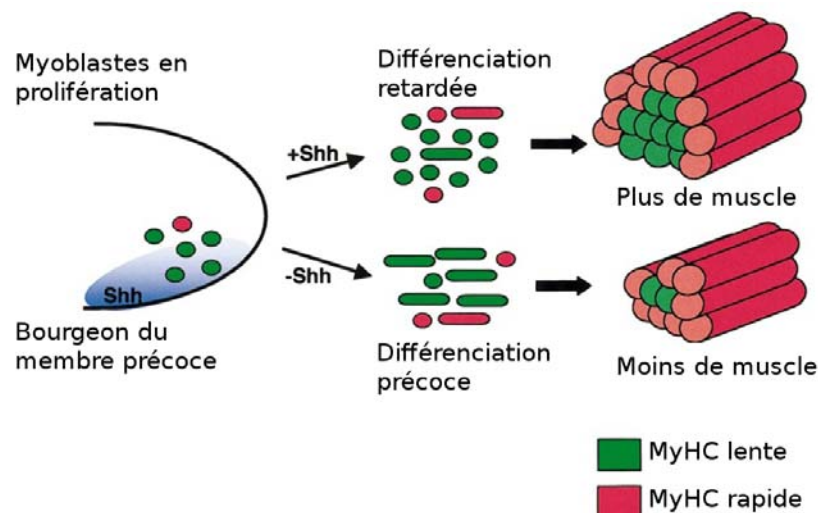


Figure 9 : Modèle de la fonction de *Shh* pendant le développement embryonnaire des myoblastes au niveau hypaxial (d'après Bren-Mattison et Olwin, 2002). *Shh* réprime la différenciation des myoblastes postérieurs, permettant ainsi aux mitogènes de stimuler leur prolifération. La différenciation précoce des myoblastes, due à l'absence de *Shh*, les conduit à exprimer des MyHC lentes. Ceci conduit à une diminution du pool des myoblastes prolifératifs et à une diminution de la masse musculaire due à la perte des fibres à MyHC lentes. L'augmentation de *Shh* maintient les myoblastes primaires dans un état indifférencié, permettant aux mitogènes d'augmenter le pool de précurseurs musculaires. Cela permet une expression ectopique de MyHC lentes et une augmentation de la masse musculaire.

L'activité calcique, permet le développement et le maintien des fibres lentes chez l'adulte, via une sérine/thréonine phosphatase, la calcineurine (Chin *et al.*, 1998 ; Dunn *et al.*, 1999 ; Bigard *et al.*, 2000 ; Naya *et al.*, 2000 ; Serrano *et al.*, 2001). Alors que dans le membre embryonnaire *Wnt5a* active le signal calcique, ce qui entraîne le développement des fibres

lentes (Slusarski *et al.*, 1997; Kühl *et al.*, 2000 ; Anakwe *et al.*, 2003). Les fibres lentes possèdent un haut niveau de calcium comparé aux fibres rapides où de courts flux sont observés lors de la contraction.

### Les cellules satellites

*Pax7* est l'élément clé dans la biogenèse des cellules satellites. En son absence les cellules satellites vont progressivement disparaître par apoptose, pour être en nombre très réduit chez l'adulte. *Pax3* est exprimé dans quelques cellules satellites, mais son faible niveau d'expression l'empêche de compenser la perte de l'activité anti-apoptotique en absence de *Pax7* (Seale *et al.*, 2000 ; Relaix *et al.*, 2006 ; Oustania *et al.*, 2004). *Myf5* est transcrit dans la plupart des cellules satellites ce qui les destine à la myogenèse (Beauchamp *et al.*, 2000)

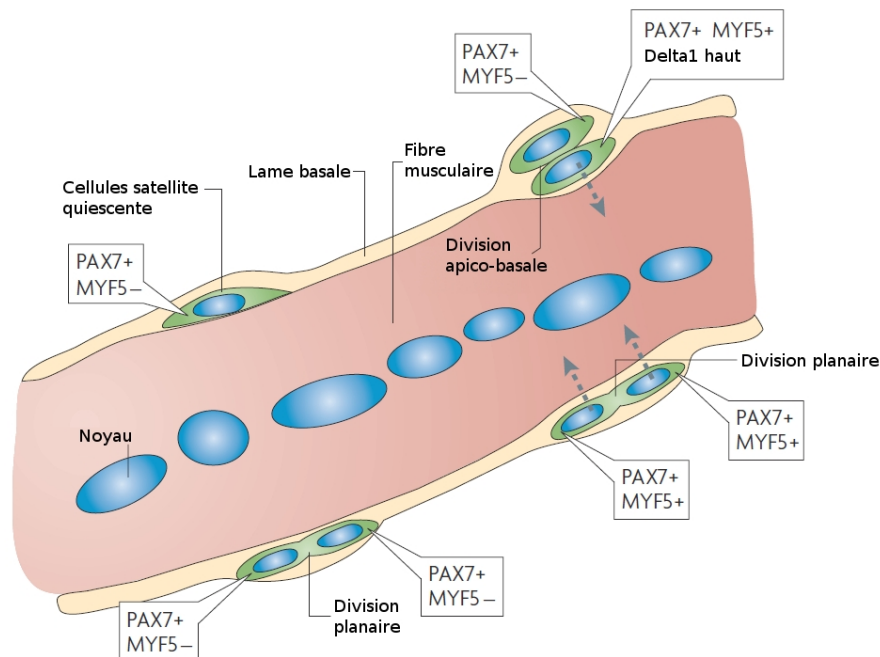


Figure 10 : Myogenèse chez l'adulte (d'après Bryson-Richardson *et al.*, 2008). Les cellules satellites (en vert) expriment différents marqueurs spécifiques tels que PAX7, C-MET, ou M-cadherine. Elles peuvent donner des précurseurs musculaires exprimant MYF5 (MYF5+) et maintenir un pool de cellules satellites (MYF5-). Celles présentant une division planaire donnent généralement des cellules filles avec une expression de MYF5 symétrique. Celles se divisant de manière apico-basale donnent généralement des cellules filles avec une expression de MYF5 asymétrique.

Les cellules satellites se divisent de manière asymétrique (Figure 10) ce qui entraîne la ségrégation des déterminants myogéniques Delta, Numb et Myf5 dans l'une ou l'autre des cellules filles exprimant *Pax7*. Ce processus est caractéristique du renouvellement des populations de cellules souches. Cette division semble s'accompagner de la rétention de l'ADN parental dans les cellules contenant *Pax7* et *Numb*. Cette « immortalisation » de l'ADN parental paraît être un attribut spécifique des cellules souches (Shinin *et al.*, 2006 ; Kuang *et al.*, 2007).

Les cellules progénitrices musculaires peuvent avoir plusieurs sources, le mésenchyme du bourgeon du membre (Bailey *et al.*, 2001), la dorsale aortique embryonnaire (De Angelis *et al.*, 1999), dans le muscle lui-même elles sont alors appelées « population de réserve dérivée du muscle » (Guissoni *et al.*, 1999). Les cellules satellites peuvent aussi dériver d'autres tissus, tels que la moelle osseuse, les lignées vasculaire et hématopoïétique (Péault *et al.*, 2007).

Le muscle squelettique est une structure hétérogène formée de fibres rapides et lentes, de cellules satellites ainsi que de vaisseaux sanguins. Les myoblastes qui le composent proviennent des somites qui sous l'effet de plusieurs facteurs (*Pax*, *MRF*, *FGF*...) vont se délaminer et migrer vers leur lieu de différenciation et de fusion. La fusion des myoblastes donne des fibres musculaires qui vont se regrouper en structure particulière donnant le muscle squelettique.

## **1.4 La myostatine (Gdf8)**

### **1.4.1 Structure**

La myostatine appartient à la famille des  $TGF\beta$  et en possède toutes les caractéristiques : une séquence signal pour la sécrétion, un site de clivage protéolytique, un motif conservé de 9 cystéines (comme dans le  $TGF\beta$  et l'inhibine B) et un nœud cystéine essentiel pour l'activité de cette famille de protéines. Cependant, la myostatine n'appartient pas aux groupes classiques tels que ceux des BMP ou de l'inhibine, cette déviation est évidente dans la région

C-terminale. Parmi ces sous-familles elle est la plus homologue avec Vgr1 (Bmp6) (45% d'identité en C-terminal) (McPherron *et al.*, 1997). La myostatine est très conservée entre les espèces, chez la souris, le rat, l'homme, le porc, le poulet, la dinde elle présente 100% d'identité dans sa partie C-terminale. Chez le babouin, le bovin et l'ovin elle ne diffère que de 1 à 3 acides aminés alors que chez le poisson zèbre il n'existe plus que 88% d'identité (McPherron *et al.*, 1997). De plus, la myostatine possède un fort pourcentage d'identité avec Gdf11.

L'expression de *Gdf8* varie suivant le muscle observé. Il existe un haut niveau d'expression dans les muscles squelettiques tels que les muscles *M. Semimembranosus* et *M. Biceps femoris*, un bas niveau dans les autres muscles des membres postérieurs et aucune expression au niveau du cœur et du diaphragme (Kambadur *et al.*, 1997).

La séquence régulatrice de *Gdf8* présente une grande homologie entre les espèces. Elle comprend plusieurs motifs de liaison à des facteurs de transcription (Ma *et al.*, 2001, 2003): des boîtes E pour la liaison à MyoD qui donne la spécificité musculaire (Xu *et al.*, 2003 ; Salerno *et al.*, 2004 ; Spiller *et al.*, 2002), des sites de liaison à MEF2, NFκB (région d'homologie avec la séquence de liaison) et des sites PPARγ (Peroxyisome Proliferator Activated Receptor γ). Des séquences consensus de liaison aux hormones : ARE (Androgen Response Element), GRE (Glucocorticoïd Response Element), TRE (Thyroïd hormon Response Element) sont aussi présentes.

La myostatine est produite sous la forme d'un précurseur protéique possédant une séquence signal, un domaine propeptide en N-terminal et un domaine C-terminal constituant le ligand actif (McPherron *et al.*, 1997) (Figure 11). Le clivage du précurseur protéique au site RSRR permet la libération du propeptide N-terminal et de la forme mature de la myostatine. Le propeptide et la forme mature de la myostatine peuvent se dimériser grâce à la formation de ponts disulfures. La myostatine mature est la seule forme active de la protéine. Dans le sérum, de nombreuses protéines peuvent se lier à la myostatine et inhiber son activité comme Gasp1 (Growth and differentiation-associated factor-Associated Serum Protein-1) et Flrg (follistatin-related gene ; Hill *et al.*, 2002 ; 2003) et au niveau musculaire hSTG (Wang *et al.*, 2003), titin-cap (Nicholas *et al.*, 2002), follistatine (Amthor *et al.*, 2004).



Figure 11 : Structure de la protéine myostatine. La myostatine possède un peptide signal (PS) en bleu, une région propeptide en violet qui sera clivée au site RSRR durant la maturation et le peptide actif en partie C-terminal en vert.

La région propeptide permet un repliement et une dimérisation correcte du peptide C-terminal mais aussi la régulation de son activité biologique grâce à la formation du complexe latent. C'est la forme sous laquelle la myostatine est sécrétée (Lee et McPherron, 2001 ; Wolfman *et al.*, 2003). Ce complexe est constitué de la région propeptide s'associant de façon non covalente avec un dimère C-terminal mature.

#### 1.4.2 Fonction au cours de la myogenèse

Au niveau sérique, la myostatine circule sous la forme d'un complexe latent, elle peut aussi former un complexe avec Flrg et Gasp1 (Hill *et al.*, 2002, 2003).

Les différents éléments de la voie de signalisation de la myostatine ont été définis en 2003 (Rebbapragada *et al.*, 2003) (Figure 12). Le dimère de myostatine C-terminal mature se lie avec une haute affinité à ActRIIB (récepteur à l'activine IIB), il peut aussi se lier à ActRIIA qui est très proche (Lee et McPherron, 2001 ; Rebbapragada *et al.*, 2003). Suite à cette liaison, la cascade du signal intracellulaire est initiée par le recrutement d'un récepteur de faible affinité de type I, qui est soit ALK4 (activin-like kinase-4) soit ALK5. La formation de cet hétérodimère par la myostatine permet au domaine kinase constitutivement actif d'ActRIIB de transphosphoryler le récepteur de type I ALK4/5 au niveau de la région GS qui est intracellulaire et proche de la membrane. Cette phosphorylation entraîne l'activation d'un domaine sérine/thréonine kinase. Cela permet au récepteur de type I activé de phosphoryler smad2 et smad3 qui interagissent alors avec le co-smad, smad4, et se transloquent dans le noyau. Le complexe smad se lie directement à l'ADN et interagit avec les coactivateurs ou corépresseurs nucléaires afin de réguler l'expression des gènes cibles de la myostatine (Zhu *et al.*, 2004).

Le signal de la myostatine peut aussi passer par une voie de signalisation smad-indépendante, via la voie des MAP kinases mais les détails de ce mécanisme d'activation restent à déterminer (Philip *et al.*, 2005).

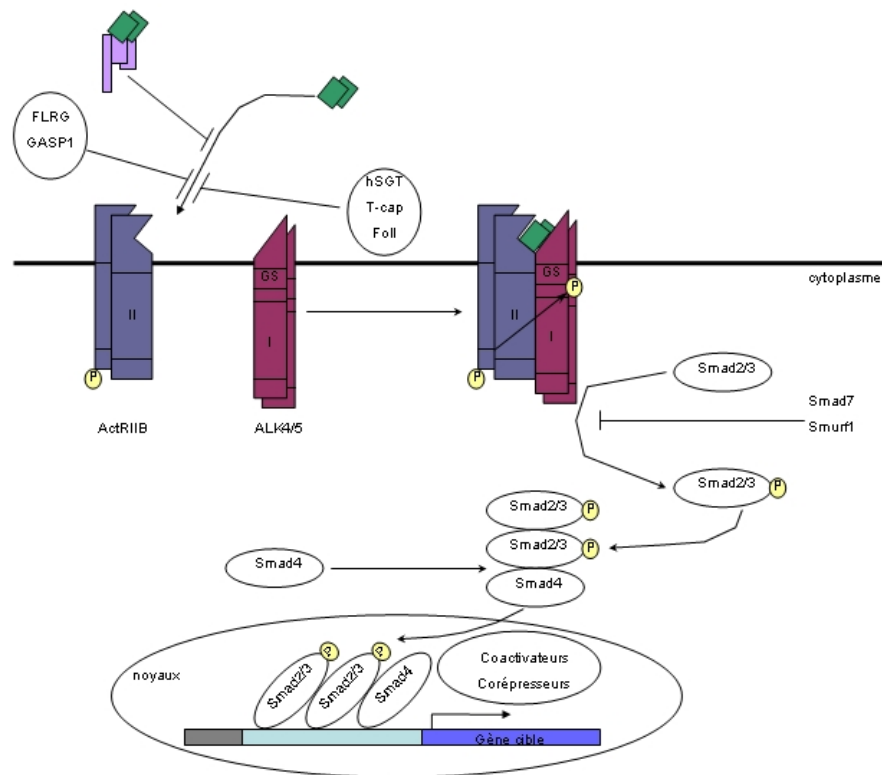


Figure 12 : Voie de signalisation de la myostatine (d'après Joulia-Ekaza *et al.*, 2006). La myostatine peut être trouvée dans un état inactif lorsqu'elle est liée à Flrg, Gasp1, hSGT, T-cap, la follistatine ou au propeptide de la myostatine. Le dimère actif de la myostatine se lie au récepteur de type II, ActRIIB, puis recrute et active le récepteur de type I, ALK4 ou ALK5, par transphosphorylation. Smad2 et Smad3 sont ensuite activés et se lient avec Smad4. Ils sont alors transloqués dans le noyau où ils activent la transcription du gène cible. Deux inhibiteurs de ce signal ont été identifiés : Smad7 réprime le signal en liant son domaine MH2 au récepteur activé empêchant ainsi le recrutement de R-Smads. Smurf1 est une ligase ubiquitine qui entraîne l'ubiquitination et la dégradation consécutive des R-Smads.

Chez la souris, la myostatine peut être détectée dans le muscle squelettique dès 9,5 jours *post coitum* (jpc) (McPherron *et al.*, 1997), l'ARNm et la protéine sont retrouvés dans d'autres tissus et dans le plasma (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998 ; Ostbye *et al.*, 2001 ; Ji *et al.*, 1998).

Chez le poisson, il existe deux isoformes de la myostatine dans une grande diversité d'organes (Ostbye *et al.*, 2001 ; Roberts *et al.*, 2001 ; Rescan *et al.*, 2001). L'ARNm est exprimé préférentiellement dans le muscle rouge (Roberts *et al.*, 2001 ; Rescan *et al.*, 2001) ce qui suggère qu'elle serait impliquée dans les différences du taux de croissance entre les muscles lents et rapides.

Au niveau musculaire, la myostatine agit sur la prolifération des myoblastes (Rios *et al.*, 2001 ; Taylor *et al.*, 2001 ; Joulia *et al.*, 2003 ; Thomas *et al.*, 2000), elle peut aussi agir sur la différenciation (Langley *et al.*, 2002) lors du développement alors que la taille des fibres

semble être dépendante de l'action de la myostatine sur les cellules satellites. Elle inhibe la prolifération en stimulant p21 et en diminuant les niveaux de Cdk2 (cyclin-dépendent kinase 2) et de Rb (retinoblastoma protein) phosphorylées, ce qui a pour effet l'inhibition du cycle cellulaire (Rios *et al.*, 2001 ; Thomas *et al.*, 2000) (Figure 13). Sans myostatine, il se produit une diminution de p21 et du temps de doublement cellulaire (Joulia *et al.*, 2003).

L'effet de la myostatine sur la différenciation semble passer par l'inhibition des facteurs de différenciation myogénique MyoD, Myf5 et Myogénine (Joulia *et al.*, 2003 ; Langley *et al.*, 2002 ; Rios *et al.*, 2002). Cependant, MyoD n'est pas une cible de la myostatine endogène (Joulia *et al.*, 2003). Son inhibition passe par un intermédiaire qui est p21. Pendant la différenciation la myostatine provoque une diminution de l'activité du promoteur de p21 conduisant à la baisse de son expression (Langley *et al.*, 2002). Cela conduit à la diminution de l'expression de *MyoD*. Les cibles majeures et physiologiques de la myostatine endogène semblent être la Myogénine et p21 (un CKI) (Joulia *et al.*, 2003).

La surexpression de la myostatine diminue grandement l'apoptose via la régulation de p21 et le rôle anti-apoptotique des CKI (Wang *et al.*, 1996).

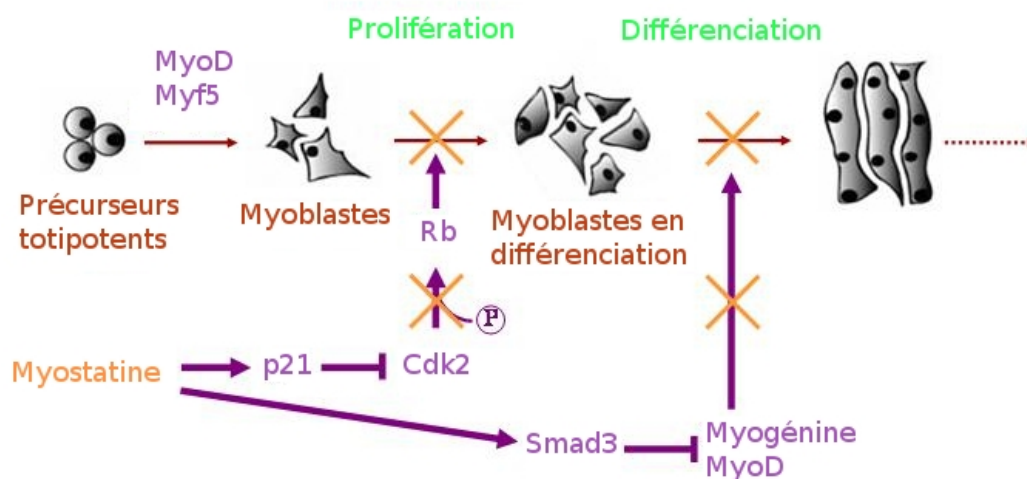


Figure 13 : Rôle de la myostatine dans la croissance musculaire (d'après Thomas *et al.*, 2000 ; Langley *et al.*, 2002). Pendant la myogenèse embryonnaire, Myf5 et MyoD mènent les cellules dans la voie myogénique. La prolifération des myoblastes est régulée par la myostatine via la stimulation de p21 et l'inactivation de l'activité de Cdk2. Cela provoque l'hypophosphorylation du retinoblastome (Rb) et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. En réponse au signal de différenciation, MyoD devient pleinement fonctionnel activant l'expression des gènes de la myogenèse, ce qui inclut la Myogénine et p21. Il en résulte la fusion des myoblastes en myotubes multinucléés. La myostatine régule ce processus en inhibant l'expression de *MyoD* par l'intermédiaire de Smad3. Alors les signaux myogéniques sont perdus ainsi que la différenciation myogénique.



La myostatine appartient à la famille des TGF $\beta$ , elle est très conservée entre les espèces. Elle est sécrétée sous la forme d'un complexe inactif composé de la forme mature de la myostatine et de son propeptide. Elle peut se lier à d'autres protéines possédant un domaine follistatine. Au niveau musculaire, elle inhibe la prolifération des myoblastes et leur différenciation en myotubes.

## 1.5 Le phénotype « culard » et la myostatine

### 1.5.1 Le phénotype « culard »

Le phénotype de double musculature est observé depuis 200 ans. Au cours des années 1970 – 1980, les causes qui sont évoquées pour être à l'origine de l'hypertrophie musculaire bovine sont des anomalies au niveau de la membrane cellulaire ou bien un déséquilibre endocrinien.

Des différences au niveau hormonal ont pu être observées chez les veaux. Ceux présentant une hypertrophie musculaire sont plus légers à la naissance que les normaux. Après le sevrage, le taux de croissance est plus bas à cause d'un taux d'hormone de croissance plus faible que chez les veaux sauvages. Cet état dure jusqu'à 4 mois et demi. Le taux d'insuline est aussi plus faible chez les individus à double musculature (Arthur *et al.*, 1989). L'insuline est impliquée dans le métabolisme lipidique, favorisant la lipogenèse et inhibant la lipolyse (Brockman, 1978). Ces hormones sont évoquées de par leur rôle : l'hormone de croissance intervient dans la synthèse de protéines dans le muscle, la croissance linéaire du squelette, et l'insuline permet la synthèse de métabolites. L'hypertrophie musculaire ne s'accompagne pas d'une croissance linéaire du squelette plus importante (Arthur *et al.*, 1989). Cela indique qu'un facteur autre que l'hormone de croissance est responsable de cette hypertrophie (Arthur *et al.*, 1989).

Depuis, les études chez le bovin à double musculature (DM) ou « culard » ont permis d'autres observations. Ils possèdent, par rapport aux bovins normaux, un faible taux d'hormone de croissance (Hocquette *et al.*, 1999), d'insuline (Arthur *et al.*, 1990), de créatine et d'ARNm au niveau musculaire pour l'IGF2. Cependant la créatinine présente un taux plus élevé (Istasse *et al.*, 1990). De plus, une concentration de lactate supérieure est observée chez les bovins DM, cela étant causé par une plus grande sensibilité au stress (Holmes *et al.*, 1973). Le niveau de graisse intramusculaire chez les individus de génotype DM est inférieur d'environ 50% aux

individus sauvages (Hocquette *et al.*, 1999), ce qui provoque une diminution de la flaveur. Cependant, la proportion des acides gras insaturés est supérieure chez les individus DM en comparaison à des individus sauvages (Webb *et al.*, 1998). Ce faible dépôt de gras n'est pas lié à la nutrition mais à une plus faible concentration plasmatique en hormones lipogéniques (insuline, T3) ou en métabolites comme le glucose. Le dépôt de gras est moins important chez les individus DM à cause d'un nombre et d'une taille réduite des adipocytes (Hocquette *et al.*, 1999).

La naissance, la nourriture et le sexe ont aussi une influence sur ce phénotype. En 1991 Hanset observe, contrairement à ce qui est observé par Arthur et coll. (1989), que les animaux DM possèdent un poids plus élevé à la naissance à cause d'une période de gestation plus longue. Cependant, du fait de la musculature plus importante du pelvis, les naissances sans assistance vétérinaire se révèlent problématiques (Wiener *et al.*, 2002). Les individus hétérozygotes n'ont pas ce problème car l'allèle mutant est partiellement récessif. L'hétérozygotie a des effets sur la musculature, cependant le phénotype de double musculature requiert l'homozygotie (Hanset et Michaux, 1985 ; Charlier *et al.*, 1995). Par conséquent il est préférable d'avoir des mères hétérozygotes donnant naissance à des individus homozygotes, ce qui permet à la fois de diminuer le coût et les risques de perte des animaux. En plus des modifications phénotypiques déjà évoquées, d'autres peuvent être observées comme une réduction des organes internes (Hocquette *et al.*, 1999), et de la fertilité chez les femelles, une baisse de la viabilité à la naissance et un retard de maturation sexuelle. Au niveau cellulaire, une hyperplasie musculaire est observée chez le bovin à la différence de chez la souris où ce phénotype d'hypermusculature a pour origine une hypertrophie et une hyperplasie musculaire. Cette hypertrophie n'a pas été observé chez le bovin car la section des fibres musculaires est comparable entre la race Bleu Blanc Belge et une race n'ayant pas de double musculature (Wegner *et al.*, 2000). Cette différence de phénotype peut être attribuée la sélection bovine pendant laquelle d'autres gènes ont été sélectionnés.

### **1.5.2 Les causes génétiques du phénotype « culard »**

Le phénotype « culard » a pour origine génétique une mutation au sein du gène de la myostatine (*GDF8*) (Kambadur *et al.*, 1997 ; McPherron *et al.*, 1997), elle conduit à une augmentation de 20 à 25% de la masse musculaire. Les mutations à l'origine du phénotype

d'hypermuscularité n'empêchent pas l'expression de *Gdf8* mais elles conduisent à la production d'une forme protéique ayant une activité altérée.

### Une grande variété de mutation chez le bovin

Différentes mutations au sein de *GDF8* ont été identifiées chez le bovin (Figure 14). La première d'entre elle est une délétion de 11pb en position 821 (Exon 3) causant l'apparition d'un codon stop (*nt821(del11)*) (Grobet *et al.*, 1997). Cette mutation qui provoque un phénotype d'hypermusculature, peut être retrouvée dans la plupart des races européennes (Dunner *et al.*, 2003).

Grobet et coll. (1998) ont identifié d'autres mutations de *GDF8*, certaines entraînent la formation d'un codon stop de manière prématurée. C'est le cas pour l'insertion/délétion en position 419 avec un remplacement de 7pb (*nt419(del7-ins10)*), ainsi que pour les substitutions de 2 bases dans l'exon 2 provoquant les transitions C>T en 610 (*Q204X*) et G>T en 676 (*E226X*).

La transition G>A en 938 (*C313Y*) provoque un changement de résidu cystéine en tyrosine. Cela induit une modification de structure de la protéine car cette une cystéine conservée au cours de l'évolution est impliquée dans un pont disulfure intramoléculaire.

La transition C>A en 282 (*F94L*) n'entraîne pas un phénotype musculaire important et la transition C>T dans l'exon 2 (*nt414(C-T)*) est silencieuse. De plus, 4 mutations sont connues au niveau des introns : *nt374-51(T-C)*, *nt374-50(G-A)*, *nt374-16(del1)*, *nt748-78(del1)*.

Récemment, une transition G>T en 871 a été identifiée entraînant un phénotype d'hypermusculature (Marchitelli *et al.*, 2003). Elle modifie un résidu acide glutamique en codon stop (*E291X*) et crée un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction Tru91 permettant un génotypage par PCR-RFLP.

L'analyse génétique du gène de la myostatine et l'identification des individus porteurs de mutations au sein d'une population peut contribuer à l'amélioration des programmes de sélection.

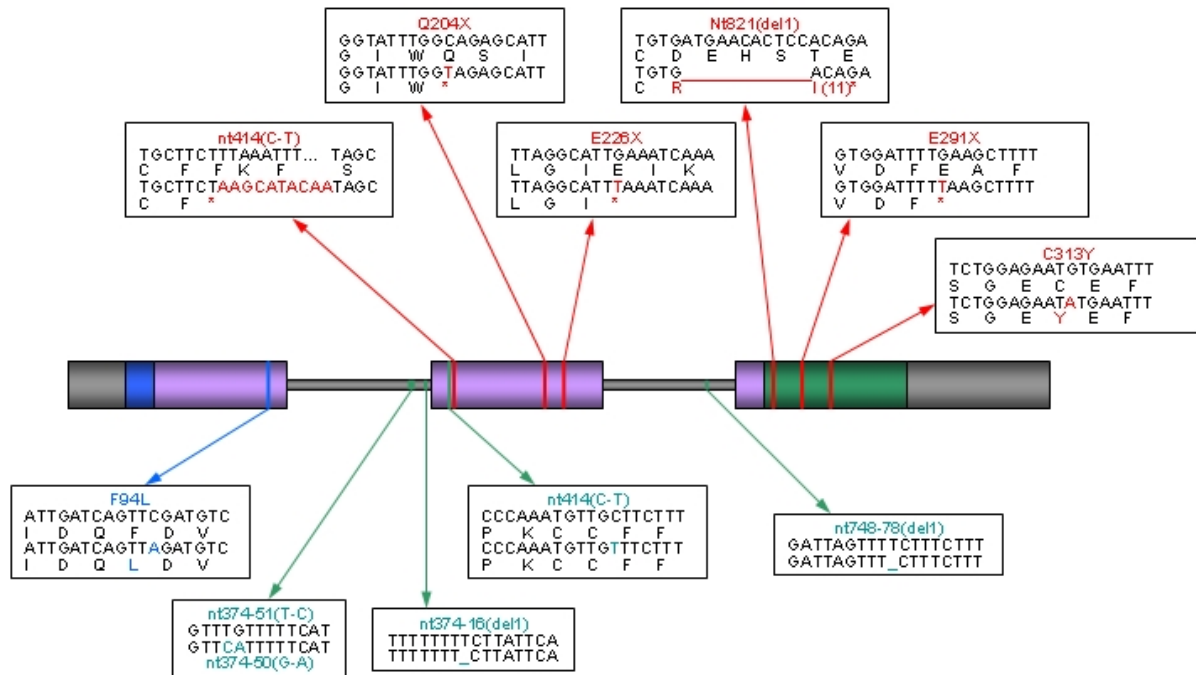


Figure 14 : Mutations bovines de *GDF8* (d'après Grobet *et al.*, 1997 ; Marchitelli *et al.*, 2003). Les parties grises représentent les parties 5' et 3' non traduites (épaisses) et les introns (fines). Les parties bleue, violette et verte représentent respectivement la séquence signal, le peptide N-terminal associé au peptide actif et le domaine C-terminal bioactif de la protéine. Les barres bleue, verte et rouge correspondent respectivement aux mutations silencieuses, conservatrice et non-sens. Dans les boîtes se trouvent le détail des mutations, la séquence de référence provient de la race Holstein-Friesian. Les différences sont mises en valeur par la couleur.

### Mutations au sein d'autres espèces

Des mutations au sein de *Gdf8* entraînant un phénotype d'hypermuscularité ont été identifiées au sein d'autres espèces (Figure 15).

Chez l'homme, il existe une mutation spontanée dans le gène de la myostatine (Figure 12C, D). C'est une transition G>A au nucléotide g.IVS1+5 qui induit un défaut d'épissage (Schuelke *et al.*, 2004). Cette position est connue comme étant un site de mutation pour les sites donneur d'épissage (Krawczak *et al.*, 1992).

En 2006 chez le mouton, Clop *et coll.*, ont identifié un polymorphisme de nucléotide (SNP) (g+6723G-A) créant un motif (ACATTCCA). Ces octamères (ACATTCCA) sont la cible des micro-ARN (miARN) miR-1, miR-206 et miR-122a, ce dernier n'étant pas exprimé au niveau musculaire (Xie *et al.*, 2005). Le miR-1 est très exprimé au niveau du muscle squelettique et du cœur chez la souris (Zhao *et al.*, 2005). Ce SNP entraîne la création d'un site illégitime pour au moins deux miARN fortement exprimé dans le muscle, provoquant ainsi la sous-

expression de *GDF8*. Les SNP peuvent affecter les octamères cibles de miARN (création, destruction) et provoquer une modification de l'expression des gènes (Clop *et al.*, 2006).

Chez la souris, une mutation spontanée *Compact* (*Cmpt*) induit le phénotype d'hypermusculature (Figure 12B). Le locus de *Cmpt* est très proche du marqueur microsatellite D1Mit237 (situé sur le chromosome 1 murin) (Szabo *et al.*, 1998). Ce locus correspond au segment du chromosome 2 humain 2q32-35 et au chromosome 2 bovin où est cartographié le gène *mh* de la double musculature (Charlier *et al.*, 1995). La mutation à l'origine de ce phénotype s'avère être une délétion dans le gène de la myostatine de 12pb entre les nucléotides 775 et 786 éliminant ainsi les acides aminés 224 à 228. Cela crée un nouveau mutant *Gdf8*<sup>Cmpt-d11Abc</sup>.

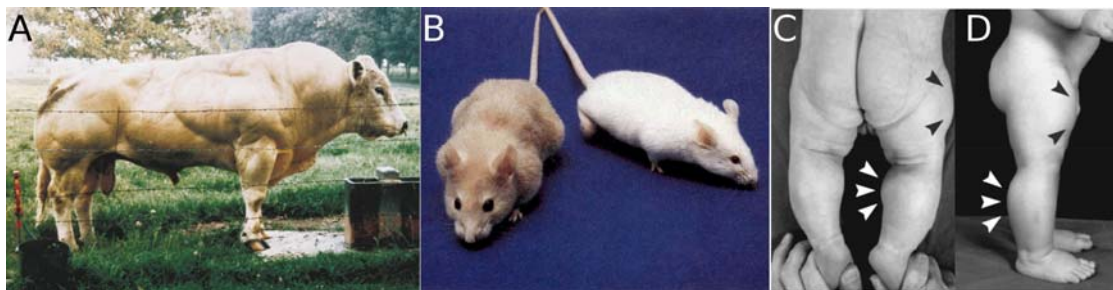


Figure 15 : Phénotype d'hypermusculature chez le bovin, la souris et l'homme (McPherron *et al.*, 1997 ; Varga *et al.*, 1997 ; Schuelke *et al.*, 2004). **A**) Taureau Bleu Blanc Belge pure race **B**) Souris avec un phénotype normal (à droite) comparée à une souris avec le phénotype *Compact* (hypermusclé, à gauche) **C**, **D**) Enfant à 6 jours et 7 mois, les flèches indiquent l'hypertrophie des muscles au niveau des cuisses et des mollets.

Chez le modèle murin KO pour *Gdf8*, une augmentation de la taille de 30% par rapport aux individus sauvages ou hétérozygotes et une augmentation de la masse de deux à trois fois sont observées. L'augmentation de la masse musculaire est due à une hyperplasie cellulaire (observée par la quantification de l'ADN dans le muscle) et une hypertrophie des fibres musculaires de 7 à 22% (McPherron *et al.*, 1997 ; Lee et McPherron, 2001). Ces paramètres varient suivant les muscles observés, comme cela avait déjà été décrit chez les bovins « hypermusclés ». La réalisation d'un KO conditionnel en post-natal provoque une hypertrophie généralisée qui est équivalente à un KO constitutif (Grobet *et al.*, 2003).

Des inhibitions de la myostatine ont été réalisées par différentes approches. Une surexpression de la myostatine présentant une absence du site de clivage permet à la protéine

d'agir comme un dominant négatif et d'empêcher la formation de dimère actif (souris dnMS) (Zhu *et al.*, 2000). Les autres approches utilisées sont une surexpression du propeptide de la myostatine sous le contrôle du promoteur de la chaîne légère de la myosine (MLC1) qui forme un complexe avec la myostatine (Yang *et al.*, 2001 ; Lee et McPherron, 2001) et l'utilisation d'un anticorps bloquant la myostatine (Whittemore *et al.*, 2003). Ces inhibitions de la myostatine provoquent une augmentation de la masse musculaire pouvant atteindre celle obtenue lors de l'inactivation de la myostatine. McPherron et coll. (1997) n'ont pas vu de différence dans la masse de graisse entre les souris sauvages et *Gdf8* KO à 8 semaines. Cependant à 32 semaines elle est réduite de 70% chez les souris *Gdf8* KO. Chez la souris *Gdf8* KO, l'augmentation du poids a pour origine l'augmentation de la masse musculaire. Alors que chez le bovin cette augmentation musculaire s'accompagne de l'augmentation du poids de la peau, des tissus adipeux, des os, du tractus digestif et de la plupart des organes internes. Les raisons de cette différence demeurent inconnues.

Le phénotype « culard » est observé depuis des siècles. Ces bovins présentent une double musculature causée par une hyperplasie des fibres musculaires qui est accompagnée d'une réduction de la quantité de gras intramusculaire. L'origine de ce phénotype est une mutation au sein du gène de la myostatine conduisant à la production d'une protéine inactive qui ne peut plus inhiber le développement musculaire. Il existe plusieurs mutations chez le bovin ainsi que chez d'autres espèces.

## 1.6 Gasp1

L'étude d'un gène codant pour un nouvel inhibiteur de la myostatine, *Gasp1* (Hill *et al.*, 2003), constitue une nouvelle approche dans l'étude de gènes déterminant les caractéristiques musculaires qui est développée au sein du laboratoire et basée sur les données disponibles chez la souris.

Les expériences de co-immunoprécipitation de la myostatine menées par Hill et coll. en 2003 ont permis d'identifier ses partenaires. Parmi toutes les protéines identifiées lors de ces expériences, un nouveau partenaire de la myostatine, *Gasp1*, a été mis en évidence.

Gasp1 peut se lier à la myostatine mais aussi à son propeptide, et il possède de nombreux domaines inhibiteurs de protéases. Il pourrait intervenir dans le développement musculaire en agissant sur la myostatine qui est elle-même un régulateur négatif de la croissance musculaire. L'hypothèse émise est que cette liaison pourrait inhiber la maturation du propeptide de la myostatine en myostatine mature, elle pourrait aussi empêcher la liaison de cette dernière à son récepteur.

L'étude de *Gasp1* apportera de nouvelles connaissances sur le développement musculaire, identifiant peut être ainsi une nouvelle voie de régulation de la myostatine.

### 1.6.1 Structure

Chez la souris, *Gasp1* est situé sur le chromosome 11 et comprend deux exons repartis sur 7kb (Figure 16). Il code pour une protéine (Figure 17) de 571 acides aminés comprenant de nombreux sites inhibiteurs de protéase qui sont des régions conservées. En raison de ces domaines *Gasp1* est aussi retrouvé sous le nom *Wfikkn2* (WAP, follistatin/kasal, immunoglobulin kunitz and netrin containing protein 2 Precursor). La protéine *Gasp1* comprend aussi deux sites de N-glycosylation potentiels sur les acides aminés 314 qui est situé entre le domaine Ig et le domaine BTPI/Kunitz 1&2, et 514 situé dans le domaine Netrine.

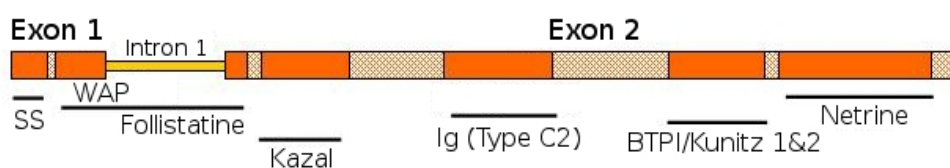


Figure 16 : Schéma du gène *Gasp1* avec la représentation des zones codant les domaines protéiques . SS : séquence signal

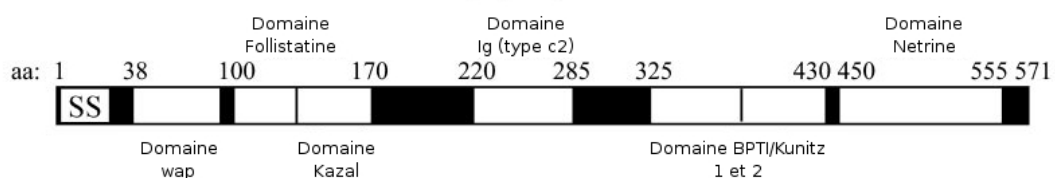


Figure 17 : Schéma des domaines de la protéine *Gasp1* (d'après Hill *et al.*, 2003). aa : acide aminé, SS : Séquence signal

Un autre gène, *Gasp2* découvert lors de l'analyse des bases de données murine montre que ce gène possède 54% d'identité avec *Gasp1* murin.

Chez l'homme, il existe des séquences homologues de *Gasp1* et de *Gasp2* (Trexler *et al.*, 2001, 2002) qui possèdent 90% d'identité avec les séquences murines (Figure 18).

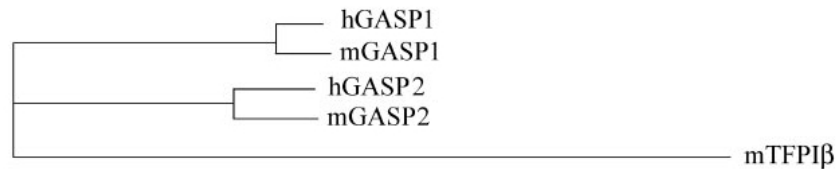


Figure 18 : Arbre phylogénétique des protéines Gasp1 et Gasp2 prédites à partir des séquences génomiques humaine et murine (Hill *et al.*, 2003). Gasp1 humain et murin possèdent 90% d'identité alors que Gasp1 et Gasp2 ne possèdent que 54% d'identité.

### 1.6.2 Expression

*Gasp1* est exprimé dans de nombreux tissus tels que le cœur et le muscle squelettique où son expression est la plus forte, mais aussi dans le foie et les reins où elle est la plus faible (Figure 19). Il est aussi exprimé au cours de l'embryogenèse avec un niveau relativement stable. Toutefois son expression est faible comparée à l'expression d'un gène de référence tel que *G3PDH*.

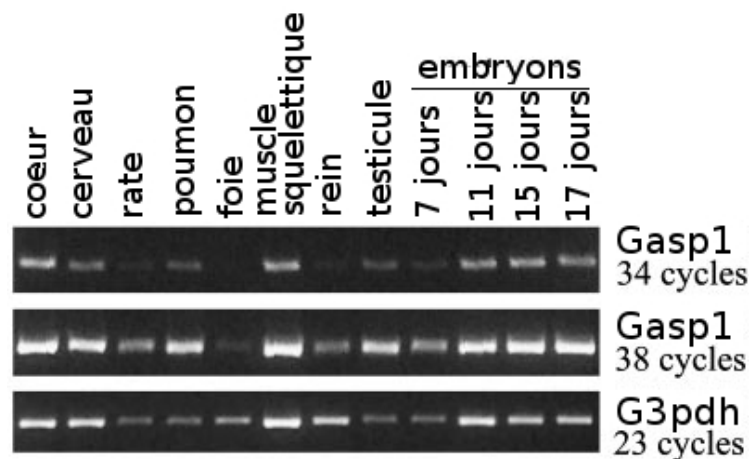


Figure 19 : Expression de *Gasp1* dans différents tissus et au cours du développement embryonnaire (d'après Hill *et al.*, 2003). Elle est visualisée par PCR semi-quantitative. *Gasp1* est le plus fortement exprimé au niveau du muscle squelettique et dans le cœur, il est aussi exprimé au cours du développement embryonnaire.



### 1.6.3 Interaction avec la myostatine

Hill et coll. (2003) ont montré par immunoprécipitation et western blot l'interaction entre Gasp1 et la myostatine (Figure 20).

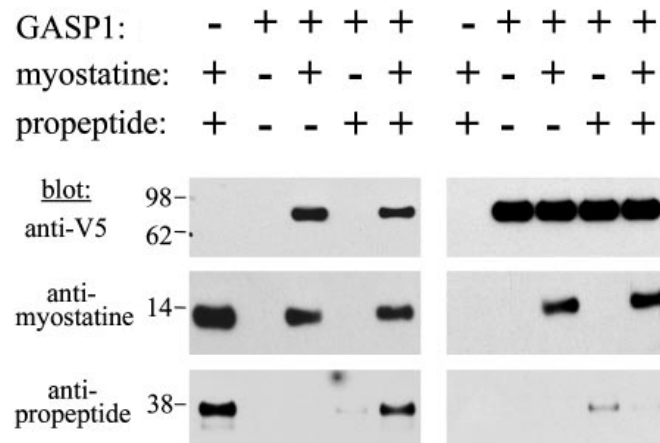


Figure 20 : Interaction entre Gasp1, la myostatine et le propeptide de la myostatine (Hill *et al.*, 2003). Western Blot, les protéines présentes sont identifiées grâce à un anticorps anti-V5 pour Gasp1, un anticorps anti-myostatine et un anticorps anti-propeptide de la myostatine. Sur la partie de gauche la myostatine est immunoprécipitée, depuis un milieu témoin ou un milieu contenant des cellules COS transfectées avec Gasp1-V5-His et qui sont supplémentés ou non avec de la myostatine ou son propeptide sous forme purifiée recombinante. La partie droite est la réplique de la gauche, à l'exception de Gasp1-V5-His qui est immunoprécipité à la place de la myostatine. V5 : peptide dérivé des protéines P et V du paramixovirus de séquence GKPIPPLLGLDST.

Gasp1 peut se lier indépendamment au propeptide et à la forme mature de la myostatine. Cependant, en contact avec ces deux protéines Gasp1 se lie de façon plus importante avec la myostatine mature ce qui indiquerait une compétition avec le propeptide. D'autre part, le propeptide et la forme mature de la myostatine sont immunoprécipités par l'anticorps anti-myostatine, ce qui empêche de conclure sur le fait que Gasp1 peut se lier au complexe latent de la myostatine.

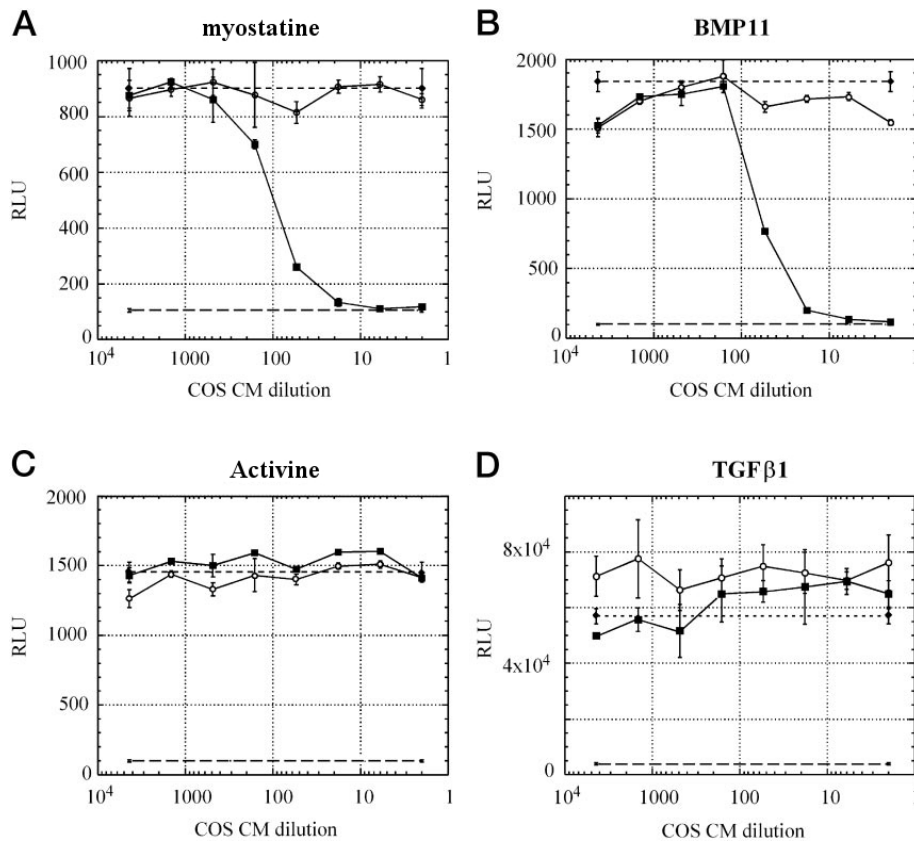


Figure 21: Inhibition de l'activité A) de la myostatine B) de BMP11 C) de l'activine et D) du TGFβ1 en fonction de la quantité de Gasp1 (d'après Hill *et al.*, 2003). Cette inhibition est visualisée grâce à l'activité d'une protéine rapportrice, la luciférase. Son activité seule correspond à la ligne en pointillés sans symbole et en présence des molécules servant au test d'inhibition elle correspond à la ligne en pointillés avec les diamants. La ligne avec les cercles blancs correspond aux dilutions d'un milieu sans Gasp1-V5-His (témoin négatif) et celle avec les carrés noirs aux dilutions d'un milieu avec Gasp1-V5-His. Le test est fait avec une concentration de 10ng/mL de myostatine, de BMP11 et d'activine, elle est de 0,5ng/mL pour le TGFβ1.

La follistatine et Flrg (follistatin-related gene) sont deux protéines à domaine FS capables d'inhiber la myostatine, mais aussi des protéines voisines telles que l'activine et BMP11 (Hill *et al.*, 2002 ; Gammer *et al.*, 1999 ; Nakamura *et al.*, 1990 ; Tsuchida *et al.*, 2000). Du fait de la présence d'un domaine FS, la capacité d'inhibition de Gasp1 envers la myostatine, BMP11, l'activine et le TGFβ1 a été testée dans un système rapporteur luciférase (Figure 21). L'activité de la myostatine est inhibée de manière dose dépendante de même que BMP11. Cela était prévisible, ces deux protéines ne différant que de 11 acides aminés. L'activine et le TGFβ1 ne sont pas inhibés ce qui suggère un niveau de spécificité qui n'avait pas encore été vu chez les autres protéines à domaine FS. Gasp1 montre donc une spécificité dans son inhibition de la myostatine et BMP11. L'inhibition de myostatine par Gasp1 a été quantifiée (Figure 22).

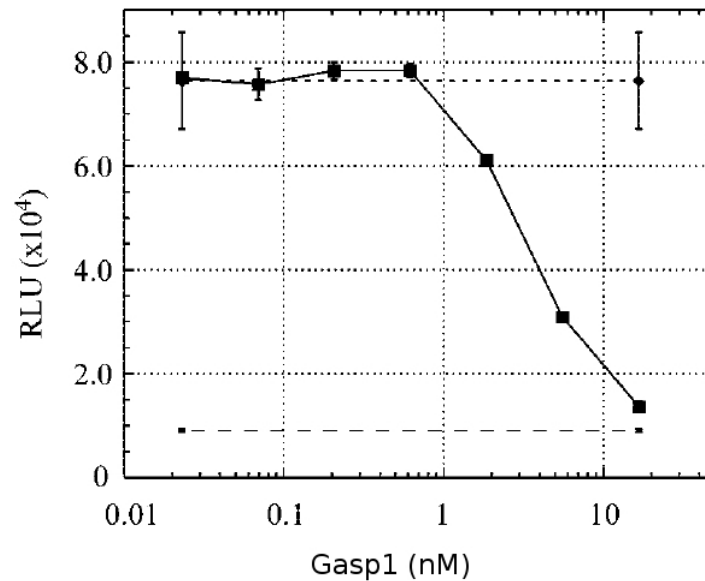


Figure 22 : Courbe d'inhibition de la myostatine (20ng/mL) par Gasp1 permettant le calcul de l' $IC_{50}$  (d'après Hill *et al.*, 2003). Cette inhibition est visualisée grâce à l'activité d'une protéine rapportrice, la luciférase. Son activité seule correspond à la ligne en pointillés sans symbole et en présence de myostatine elle correspond à la ligne en pointillée avec les diamants. L'inhibition de la myostatine est réalisée par ajout croissant de Gasp1.

L'expression de Gasp1 est relativement élevée au niveau du muscle squelettique suggérant une liaison à la myostatine pendant ou peu de temps après sa sécrétion. Gasp1 étant produit dans une grande variété de tissus, il peut être libéré dans la circulation sanguine où il pourra se lier à la myostatine. Gasp1 peut aussi jouer un rôle d'inhibiteur vis à vis d'autres facteurs de croissance tels que BMP11.

La sous-famille de la follistatine et Flrg possède un domaine N-terminal qui permet la liaison avec une haute affinité pour l'activine (Schneyer *et al.*, 2001). Gasp1 n'ayant pas de similarité significative pour ce domaine avec eux, il appartiendrait à une seconde sous-famille de protéine à domaine FS. Cette sous-famille n'est pas connue pour inhiber l'activine ou les autres membres de la famille  $TGF\beta$  (Schneyer *et al.*, 2001). Gasp1 est donc le premier exemple d'une protéine à domaine FS qui peut inhiber spécifiquement un membre de la famille  $TGF\beta$  sans inhiber l'activine, cette sélectivité est due aux régions à l'extérieur du domaine FS de Gasp1 qui facilitent sa liaison à la myostatine. Alternativement, Gasp1 peut lier la myostatine indépendamment du domaine FS. Il est intéressant de noter que Gasp1 possède la même sélectivité que le propeptide de la myostatine, ce dernier ne contient pas de domaine FS mais inhibe aussi la myostatine, BMP11 mais pas l'activine.

Gasp1 pourrait réguler l'activité de la myostatine par un mécanisme indépendant du domaine FS. Le propeptide de la myostatine coimmunoprécipite avec Gasp1 même en absence de myostatine mature alors que l'interaction myostatine-Flrg se fait par la myostatine mature (Hill *et al.*, 2002). Cette dernière pourrait entrer en compétition avec son propeptide pour la liaison à Gasp1 qui peut interagir de manière indépendante avec l'un ou l'autre. Gasp1 inhibe l'activité de la myostatine mature mais son rôle dans la régulation du propeptide est moins clair.

#### 1.6.4 Gasp1, un inhibiteur de protéase ?

Gasp1 contient de multiples domaines inhibiteurs de protéase. Deux domaines Kunitz en tandem qui sont très similaires à l'inhibiteur inter- $\alpha$ -trypsine indiquent un domaine inhibiteur de protéase à sérine certainement fonctionnel. Gasp1 pourrait aussi inhiber les métalloprotéases grâce à un domaine netrine en C-terminal (Banyai *et al.*, 1999 ; Mott *et al.*, 2000). Le domaine FS de Gasp1 est similaire au domaine inhibiteur de protéase à sérine Kazal. Plusieurs protéines à domaines FS contiennent une insertion hydrophobe dans la région entre les cystéines 6 et 7 de ces domaines, correspondant à la boucle de l'inhibiteur de protéase Kazal, ovomucoïde (Hohenester *et al.*, 1997). Cette insertion pourrait expliquer le manque de démonstration de l'activité protéase dans ces protéines (Hohenester *et al.*, 1997). Gasp1 ne contient pas d'insertion dans cette région donnant la possibilité que ce domaine puisse agir comme un inhibiteur de protéase à sérine Kazal-like fonctionnel. De par la présence de ces motifs conservés, Gasp1 pourrait agir comme un inhibiteur de protéase multifonctionnel contre les protéases à sérine et les métalloprotéases. Car chez l'homme, GASP1 et GASP2 possèdent des domaines fonctionnels homologues, notamment le deuxième domaine Kunitz donc la structure et la fonction d'inhibiteur de protéases ont été particulièrement étudiées (Trexler *et al.*, 2001 ; 2002 ; Nagy *et al.*, 2003 ; Liepinsh *et al.*, 2006)

Récemment, Kondas et coll. (2008) ont caractérisé les différents domaines de GASP1 et GASP2 par rapport à l'inhibition de GDF8 et GDF11 qui sont très proches (ces protéines ne diffèrent que de 11 acides aminés). GDF11 joue un rôle important dans l'établissement du squelette. La liaison de GASP1 ou GASP2 avec la myostatine se fait par le domaine follistatine, le domaine NTR intervient dans la liaison au propeptide de la myostatine. De plus, le premier domaine Kunitz est peu conservé, ce qui indique une faible importance pour

la liaison à la myostatine ou au propeptide de la myostatine ainsi que pour les autres fonctions. Le domaine WAP, immunoglobuline et le deuxième domaine Kunitz sont fortement conservés indiquant des domaines critiques pour l'intégrité structurale de la protéine mais aussi dans leur implication avec des protéines autre que les GDF. La liaison de GDF8 et GDF11 se fait avec une haute affinité indiquant une similarité de fonction entre GASP1 et GASP2 mais qui ne sont pas équivalentes car l'affinité varie selon le GDF auquel elle se lie. De plus, les différences entre les patrons d'expression de ces protéines qui ne coïncident que partiellement, indiquent une subfonctionnalisation dans le contrôle de GDF8 et GDF11 (Kondas *et al.*, 2008).

*In vivo*, sous le contrôle d'un promoteur fort, *Gasp1* est capable d'induire une augmentation de la masse corporelle (environ 20%) associée à un accroissement musculaire ainsi qu'une augmentation de la force de préhension, après son injection en intramusculaire (Rodino-Klapac *et al.*, 2009). Cette surexpression de *Gasp1* n'entraîne aucune modification au niveau du cœur ou des cardiomyocytes, indiquant une inhibition muscle spécifique de la myostatine.

De plus, lors la croissance longitudinale du muscle squelettique, provoquée par l'étirement, une augmentation de l'expression de *Gasp1* est constatée alors que celle de *Gdf8* est diminuée (Aoki *et al.*, 2009)

La signification biologique de ces multiples domaines inhibiteurs de protéases reste floue. Mais *Gasp1* pourrait jouer un rôle dans un processus de régulation impliquant des protéases tels que l'activation du complexe latent de la myostatine ou le clivage de la proprotéine de la myostatine pour relâcher le propeptide et la myostatine mature. *Gasp1* peut empêcher le clivage de la proprotéine par l'inhibition de protéases furin-like, il en résulterait une myostatine non clivée inactive. L'activité de la myostatine pourrait donc être régulée par un mécanisme qui n'est pas associé au domaine FS. *Gasp1* constitue une nouvelle classe de protéine inhibitrice se liant aux TGF $\beta$ .

*Gasp1* possède de nombreux domaines inhibiteurs de protéases, l'un d'eux présentant une grande similitude avec un inhibiteur trypsique. Il constitue une nouvelle classe d'inhibiteur de TGF $\beta$  de par sa séquence et les membres de la famille des TGF $\beta$  qu'il est capable d'inhiber. De plus, il peut se lier à la myostatine mature mais également à son propeptide. Sa capacité à se lier à la myostatine pourrait lui permettre de réguler le développement musculaire.

## 1.7 Projet de thèse

Les travaux effectués au cours de ma thèse consistent en une analyse fonctionnelle de *Gasp1*, en particulier son implication dans le développement musculaire. Différentes approches seront employées, génétiques et physiologiques, au sein d'un modèle murin. Ces travaux sont répartis en trois volets, le premier est la création d'un modèle animal pour lequel le gène *Gasp1* est invalidé par recombinaison homologe dans des cellules ES de souris.

Le second volet consiste à étudier les domaines d'expression du gène *Gasp1* par hybridation *in situ* sur des embryons de souris. Les domaines d'expression ainsi identifiés seront comparés à ceux de la *myostatine* et plus particulièrement au niveau musculaire.

Le troisième axe concerne l'étude de l'expression de *Gasp1* dans le modèle cellulaire myoblastique C2C12 qui est le modèle de référence pour l'étude de la prolifération et différenciation myoblastique *in vitro*.

Nos travaux devraient concourir à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement musculaire, en particulier d'élucider la fonction du gène *Gasp1* dans ce système physiologique. Au final, en s'appuyant sur les connaissances acquises dans une espèce modèle, les travaux réalisés au cours de ma thèse permettront par le transfert de ces données, chez le bovin, d'identifier si *Gasp1* est impliqué dans le phénotype d'hypermusculature chez le bovin.

## 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Biologie moléculaire

#### 2.1.1 Réactions « standards »

##### Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait à partir de tissus ou de cellules par incubation dans un tampon d'extraction (50mM Tris-HCl pH8, 100mM EDTA pH8, 100mM NaCl, 1% SDS (p/v)) avec de la protéinase K (5mg/mL), durant une nuit, à 56°C. Les protéines et les débris cellulaires sont éliminés, par centrifugation après ajout de NaCl 6M. L'ADN présent dans le surnageant est précipité par addition d'isopropanol, puis sédimenté par centrifugation. Le culot d'ADN est ensuite lavé deux fois à l'éthanol 70% (v/v), séché et repris dans du TE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8).

##### Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Le mélange de réaction de PCR comprend un tampon d'activité, des dNTP, des amorces spécifiques du fragment d'ADN à amplifier (Tableau 1), de la Taq polymérase (Uptitherm DNA Polymerase ; *Interchim*) dans les quantités recommandées par le fournisseur ainsi que de l'ADNg. La PCR comprend une dénaturation initiale de l'ADN de 5min à 94°C, 35 cycles comprenant une phase de dénaturation de 30 secondes (s) à 94°C, une phase d'hybridation de 30s à une température ( $T_m$ ) dépendante des amorces utilisées et une phase d'élongation de 1min/kb à 72°C, et une élongation finale de 5min à 72°C.

Pour les amplifications supérieures à 2kb le kit "Expand Long Template PCR System" (*Roche*) est utilisé. La "long Taq" ne possédant pas d'activité terminale transférase, les fragments issus de cette amplification nécessitent l'addition d'un A afin de pouvoir être cloné dans un vecteur TOPO<sup>®</sup>XL. Cet ajout se fait par l'incubation du produit de PCR dans du dATP et 1 unité de Taq "Uptitherm DNA Polymerase" (*Interchim*) dans son tampon d'activité.

Couple d'amorces	Séquence des amorces	Taille de l'amplicon en pb	Tm en °C
Gasp1 Exon 1	5' AAGTCAACGACAGCTGGGAG 3'	5461	57
	5' CAACTGGAGCCGACACAAATGC 3'		
NEO-SexAI	5' GGCCAGTGAATTCGAGCTCG 3'	1800	56
	5' AAGCTTGCATACCTGGTGGTC 3'		
Gasp5'	5' TCGGGACAACAACCCTAGAC 3'	675	57
	5' ATCCGCAACGGTATCTTCAC 3'		
Gasp3'	5' GCCATCAGGTCAAAGAGCAG 3'	825	59
	5' AAGCCACAGGGAGAAGAGGT 3'		
Gdf8 3' (McPherron <i>et al.</i> , 1997)	5' GAATTCAAGCACACAGGCT 3'	1378	45
	5' AAAAATGTGAAAACACTTTA 3'		
Gasp1 595pb	5' GCTCACTTGGGAGAAACAGC 3'	595	58
	5' GAAGGGACACGACTCCTCAC 3'		
Gasp1 897pb	5' TGGAGGACCGAGAGAATGTT 3'	897	58
	5' CAAAGCTATCGGGTCTCAGC 3'		
Gasp1 1,4kb	5' GAGAAATGCTGCCCAATGT 3'	1400	58
	5' CAAAGCTATCGGGTCTCAGC 3'		
Gasp1	5' AGCCAGTCACAGCAGCTGAA 3'	523	57
	5' CTCAAGCCCTGTTTGTCTCT 3'		
Gasp1 KO 5'	5' GAACCCGAGATCAAGGATCA 3'	2972	57
	5' TACGAAGTTATGCGGCCGTC 3'		
NEO	5' GGCATTCTGCACGCTTCAA 3'	276	56
	5' CCTGCAGTTCATTCAGGGCA 3'		
Gasp1 KO 3'	5' GGCTACCCGTGATATTGCTG 3'	2977	59
	5' CAACTGGAGCCGACACAAATGC 3'		

Tableau 1 : Détails des amorces utilisées. Gasp1 Exon 1 et Neo-SexAI servent à la création du vecteur de recombinaison homologue, Gasp3' et Gasp5' sont utilisées pour la création des sondes de Southern blot. Les amorces Gdf8 3', Gasp1 595, 897 et 1,4kb permettent l'obtention des sondes d'hybridation *in situ*, les Gasp1, Gasp1 KO 5' et 3' ainsi que NEO permettent le crible des souris de la lignée Gasp1 KO.

### Purification d'ADN à partir de gel d'agarose

Deux kits ont été utilisés : le kit "QIAquick® Gel Extraction Kit" (*Qiagen*) et le kit "QIAEX II Gel Extraction Kit" (*Qiagen*). Leur utilisation s'est faite suivant les instructions du fournisseur.



## Séquençage

Le séquençage est réalisé selon la méthode des didéoxynucléotides (Sanger *et al.*, 1977). La réaction de séquençage est purifiée sur des colonnes de Séphadex G50, séchée et ressuspendue dans de la formamide. Elles sont ensuite analysées en électrophorèse capillaire sur un ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

## Ligation en vecteur TOPO®

Cette ligation est réalisée en suivant les recommandations fournies dans les kits. Les vecteurs utilisés sont indiqués dans le tableau 2.

Vecteur	Insert	Antibiotique de sélection
pCR®2.1-TOPO®	Sonde Gasp3' et Gasp5'	Ampicilline
pCR®II-TOPO®	Sonde Gasp 595 et Gdf8 5'	Ampicilline
pCR®-XL-TOPO®	ADNg Gasp1	Kanamicyne
pcDNA3.1/V5-His-TOPO®	ADNc Gasp1	Ampicilline

Tableau 2 : Liste des vecteurs TOPO® utilisés. Le pCR®2.1-TOPO® permet le clonage des matrices servant à la synthèse des sondes de Southern blot, le pCR®II-TOPO® est utilisé de la même manière mais pour les sondes d'hybridation *in situ*. Le pCR®-XL-TOPO® est utilisé pour amplifier *Gasp1* lors de la création du vecteur de recombinaison pKO1. Le pcDNA3.1/V5-His-TOPO® permet la surexpression de *Gasp1* dans les cellules C2C12.

## Autres ligations

La réaction de ligation comprend du tampon de ligase 1X, une unité de T4 DNA ligase (*Ozyme*) et un mélange vecteur/insert dans un ratio 1/3 pour un volume final de 20µL. La ligation s'effectue sur la nuit à 16°C. Les vecteurs utilisés sont indiqués dans le tableau 3.

Vecteur	Insert
pBluescript pKS-	Cassette de la Thymidine Kinase (TK)
pTK	ADNg Gasp1
pUC19	Cassette de résistance à la néomycine (NEO)
pTKGASP	Cassette de résistance à la néomycine (NEO)

Tableau 3: Liste des vecteurs utilisés pour les différentes étapes de la création du vecteur de recombinaison pKO1.

**Bactéries compétentes :**

- TOP10 : souche d'*Escherichia coli* de génotype : F<sup>-</sup>*mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*.
- INV110 (Invitrogen C7171-03) : souche d'*Escherichia coli* de génotype : F' {*tra*Δ36 *proAB lacI<sup>q</sup> lacZ*ΔM15} *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44* Δ(*lac-proAB*) Δ(*mcrC-mrr*)102::Tn10 (Tet<sup>R</sup>)

La transformation de ces bactéries se fera en suivant les recommandations fournies dans les kits et leur culture se fera sur un milieu approprié à la souche et au gène de résistance à l'antibiotique présent sur le plasmide qui y est introduit.

**Extraction d'ADN plasmidique**

Deux kits sont utilisés :

- High pure isolation kit (*Roche*) pour les minipreps.
- Plasmid Midi Kit (*Qiagen*) pour les midipreps.

Leur utilisation s'est faite suivant les instructions du fournisseur.

**Southern Blot**

L'ADN génomique, après sa digestion et sa migration sur gel, est transféré par capillarité sur une membrane de nitrocellulose selon la méthode mise au point par Southern en 1975. A l'issue du transfert, l'ADN est fixé à la membrane grâce à une exposition aux UV.

La sonde utilisée est marquée au P<sup>32</sup> grâce au kit *Rediprime II Random Prime Labelling System* (Amersham Biosciences) et à l'utilisation de Klenow et d'hexanucléotides. Elle est dénaturée avant d'être ajoutée au tampon d'hybridation. L'hybridation s'effectue sur la nuit et est suivie par une série de lavages afin d'éliminer tout marquage aspécifique. La révélation se fait, dans une cassette possédant des écrans pour intensifier le signal, en exposant un film autoradiographique (*Kodak*) qui sera ensuite développé.

### 2.1.2 Hybridation *in situ*

La synthèse des sondes ARN est effectuée grâce au *DIG RNA labeling kit (Roche)*.

Un vecteur TOPO<sup>®</sup>II, dans lequel est cloné un fragment du gène d'intérêt servant de matrice pour la synthèse de la sonde ARN anti-sens, est linéarisé par HindIII, BamHI ou XhoI. La sonde est synthétisée par une ARN polymérase (T3, T7 ou SP6) pendant 2h à 37°C en présence d'un inhibiteur de RNase pour protéger les sondes synthétisées. Les sondes sont ensuite précipitées avec du LiCl 0.8M et de l'éthanol absolu et reprises dans du tampon d'hybridation (50% formamide (v/v), 5X SSC pH 4.5, 1% SDS (p/v), 50µg/mL yeast tRNA, 50 µg/mL héparine).

L'hybridation est effectuée sur des embryons *Gdf8*<sup>+/+</sup> ou *Gdf8*<sup>-/-</sup>, issus d'accouplements contrôlés. Ils sont fixés par du paraformaldéhyde (PFA) 4% dans du phosphate buffered saline (PBS) et conservés dans du méthanol. Des sondes ARN marquées à la DIG pour les gènes *Gdf8* et *Gasp1* seront utilisées (Tableau 1).

Les embryons sont réhydratés en solution méthanol (MeOH)/PBST (PBS, 0.1% (v/v) Tween 20) 70-30 (v/v), MeOH/PBST 50-50 (v/v), MeOH/PBST 30-70 (v/v), PBST pendant 5min à chaque fois puis blanchis 30min dans du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 6% (v/v) diminuant ainsi le bruit de fond des phosphatases endogènes. Ils sont à nouveau lavés dans du PBST 5min puis digérés avec de la PK (10µg/mL), 8 à 15min pour les embryons de 10.5 à 12.5 jour post coïtum (jpc), pour augmenter l'accessibilité aux ARNs cibles, la réaction est stoppée par deux lavages de 5min dans du PBST. Ils sont ensuite fixés par du PFA 4% dans du PBST pendant 15min pour éviter leur dégradation puis lavés 5min en PBST. Une pré-hybridation à 65°C est effectuée dans un tampon approprié (50% formamide, 5X SSC pH 4.5, 1% SDS, 50µg/mL yeast tRNA, 50 µg/mL héparine). Elle est suivie par l'hybridation (sonde à 1µg/mL dans du tampon de pré-hybridation) à 65°C sur la nuit.

Les embryons sont lavés dans la solution I (50% formamide, 5X SSC pH 4.5, 1%SDS dans de l'eau miliQ), la solution II (50% formamide, 2X SSC pH 4.5, 0.2%SDS dans de l'eau miliQ) trois fois 30min pour chacune. Un traitement à la RNase (100µg/mL) 1h à 37°C est réalisé après équilibrage en tampon RNase (NaCl 500mM, Tris-HCl 10mM pH 7.4, Tween20 0.1%) 5min. Puis ils sont lavés dans du MAB (100mM acide maléique, 150mM NaCl, 2mM Levamisole, 0,1% Tween 20, pH 7,5) 5min et préincubés dans du MAB/Blocking (*Roche*) 2%/Sérum de mouton inactivé 2% pendant 2 à 3h à 4°C. Finalement ils sont incubés toute la

nuit à 4°C dans du MAB/Blocking 2%/Sérum de mouton inactivé 2%/anticorps anti-DIG (*Roche*) dilué au 1/5000<sup>ème</sup>.

Une série de lavages de 1h en MAB est effectuée tout au long du troisième jour avant de laver les embryons avec du NTMT (MgCl<sub>2</sub> 50mM, NaCl 100mM, TrisHCl pH 9.5 100mM, Tween 20 0,1%)/Levamisole 2mM et coloré en BM purple (*Roche*)/Levamisole 2mM. La coloration est arrêtée par des lavages de 5min en PBS et les embryons sont conservés à 4°C dans du PBST.

### **2.1.3 Extraction des ARN totaux**

Elle s'effectue grâce au kit RNeasy (*Quiagen*). Après la lyse des cellules, les ARN sont purifiés sur une membrane de silice grâce à une série de lavages, puis ils sont élués dans de l'eau RNase free.

### **2.1.4 Vérification de la qualité des ARN (kit RNA 6000 Nano Assay, *Agilent*)**

Après avoir dosé la quantité d'ARN extraits des cellules au NanoDrop, leur qualité est vérifiée grâce au BioAnalyser 2100 d'Agilent. La puce permettant cette vérification est composée d'un réseau de capillaires dans lesquels vont migrer les échantillons lors de leur analyse dans le BioAnalyser 2100 (*Agilent*).

### **2.1.5 Transcription inverse (High Capacity cDNA Archive Kit, *Applied Biosystems*)**

La transcription inverse se fait dans un ratio maximum de 2µg d'ARN pour un volume réactionnel final de 20µL. Un mix 2X est réalisé et sera mélangé à l'ARN en volume équivalent puis incubé 10min à 25°C, 2h à 37°C et 5min à 85°C pour synthétiser les ADNc.

Le mix 2X est composé de tampon RT 2X, dNTP 8mM chacun, d'amorces aléatoire RT 2X et de MultiScribe Reverse Transcriptase 50U.

## 2.1.6 PCR quantitative en temps réel

### Syber Green

Le Syber Green est un fluorochrome qui va s'intégrer aux brins d'ADN lors de la PCR, libérant ainsi de la fluorescence au cours de l'amplification, proportionnellement à la quantité synthétisée.

La réaction d'amplification se fait dans un volume final de 17.5µL comprenant 8.75µL de mix SyberGreen, 5,25pmol de chacune des amorces et 50ng d'ADNc.

### TaqMan®

La réaction d'amplification s'effectue dans un volume final de 20µL avec du master mix 1X, la sonde 1X et 50ng d'ADNc. Le suivi de la fluorescence s'effectue sur un 7900HT Fast Real-Time PCR System d'Applied BioSystems. La réaction d'amplification comprend une incubation de 2min à 50°C, une dénaturation initiale de 10min à 95°C et 40 cycles composés de 15s de dénaturation à 95°C avant l'élongation de 1min à 60°C. Les sondes utilisées sont indiqués dans le tableau 4.

Nom	Références
Tbp	Mm00446973_m1
Gapdh	Mm99999915_g1
Beta-2-microglobuline	Mm00437762_m1
Dffa	Mm00438410_m1
Gasp1	Mm00725281_m1
Gdf8	Mm03024050_m1
MyoD	Mm00440387_m1
Myog	MM00446194_m1
Mrf4(Myf6)	Mm00435126_m1
Myf5	Mm00435125_m1
Pax3	Mm00435463_m1
Pax7	Mm0305796_s1

Tableau 4 : Sondes TaqMan® utilisées pour l'étude de l'expression des gènes de la myogenèse au cours des étapes de prolifération et de différenciation des cellules C2C12. *Tbp*, *Gapdh*, *Beta-2-microglobuline* et *Dffa* sont des sondes pour des gènes de référence. *Gasp1*, *Gdf8*, *MyoD*, *Myog*, *Myf6*, *Myf5*, *Pax3* et *Pax7* sont des sondes pour les gènes d'intérêt.

## 2.2 Culture cellulaire

### 2.2.1 Culture de cellules souches embryonnaires (ES)

#### Préparation de fibroblastes primaires

Il faut sacrifier une souris gestante à 14,5 – 15,5jpc et disséquer les embryons dans du DPBS (PBS sans CaCl<sub>2</sub> ni MgCl<sub>2</sub> ; *Gibco*). Puis dans du DPBS neuf on retire la tête et hors PBS les organes internes avant de remettre les carcasses (une dizaine) dans du DPBS pour être lavées trois fois et éliminer le plus de sang possible. Après cela les carcasses sont hachées sur de la glace au maximum 5min pour éviter d'avoir trop de mort cellulaire. Elles sont ensuite incubées 15min à 37°C dans 10mL de solution de Trypsine à 0,05% contenant 2 mg de DNaseI. Ensuite, le lysat est filtré, les agrégats cellulaires sont dissociés par addition de Trypsine jusqu'à un volume de 50mL. De la DNase peut aussi être rajoutée si la solution est trop visqueuse à cause de la libération d'ADN. Cette solution est incubée 30min à 37°C sous agitation avant d'être répartie dans deux tubes avec du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium avec 4.5g/L de glucose, 4mM de L-glutamine et 0.11g/L de pyruvate de sodium ; *Gibco*) et centrifugée 5min à 1500rpm. Le culot cellulaire est lavé deux fois dans du DMEM, s'il est trop visqueux il peut être incubé avec de la DNase pendant 30min à 37°C. Les cellules sont ensuite comptées et réparties sur boîtes de 150mm à raison de  $3,5 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Le milieu est changé le lendemain pour enlever les débris cellulaires et également après 2 à 3 jours. Quand les cellules sont à confluence, elles sont divisées au cinquième sur de nouvelles boîtes, ce qui permet d'éliminer les cellules qui ne sont pas des fibroblastes mais aussi de les amplifier avant leur congélation lorsqu'elles seront à nouveau à confluence.

#### Préparation de fibroblastes mitomycinés

Les fibroblastes primaires sont décongelés par ajout de 10mL de milieu pour fibroblastes (DMEM, 10% sérum de veau fœtal, 1% L-Glutamine, 1% Acides Aminés non essentiels) puis centrifugés 5min à 1 200rpm. Le culot est ensuite resuspendu dans 10mL de ce même milieu et étalé sur boîte 100mm à  $13 \cdot 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup>. Les cellules sont incubées 3 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> ; les cellules mortes sont éliminées le lendemain par changement du milieu. Elles peuvent être trypsinées et réétalées sur des boîtes 150mm afin d'être amplifiées. Pour le traitement à la Mitomycine C (*Sigma*), le milieu est retiré et 15mL de nouveau milieu contenant 10µg de Mitomycine C sont ajoutés et répartis de façon homogène. Les cellules sont ensuite incubées

2h30 à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Elles sont lavées 2 fois avec du DPBS avant d'être trypsinées (incubation à 37°C pendant 5min). Les agrégats cellulaires sont dissociés par pipetages successifs, la réaction est arrêtée par addition de milieu avant que les cellules soient centrifugées (1200rpm, 5min). Elles sont remises en suspension dans du milieu afin de faire une solution à 2.10<sup>5</sup>cellules/mL avant d'être étalées sur boîte.

Les fibroblastes mitomycinés sont à utiliser dans les 4 jours, après il est préférable d'en utiliser des frais. Il faut remplacer le milieu de culture pour fibroblaste par du milieu de culture pour cellule ES (DMEM, 15% sérum de veau fœtal, 10<sup>-4</sup>M β-Mercaptoéthanol, 2mM L-Glutamine, 1000U/mL de LIF) avant de mettre des cellules ES.

### **Amplification des cellules ES**

Les cellules ES sont décongelées rapidement puis transférées dans 10mL de milieu pour cellules ES et centrifugées à 1200rpm pendant 5min. Elles sont resuspendues dans 5mL de milieu avant d'être étalées sur boîte de 60mm dont le fond est recouvert de fibroblastes mitomycinés. Le jour suivant le milieu est changé. Le deuxième jour après la décongélation, les cellules sont trypsinées après deux lavages au DPBS et réétalées à l'état de cellule unique (1.10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup>) sur boîte de 100mm de fibroblastes mitomycinés.

### **Electroporation des cellules ES**

Après amplification, les cellules ES sont trypsinisées, culotées par centrifugation et resuspendues dans 1mL de DPBS. Elles sont ensuite comptées afin de mettre 7.10<sup>6</sup> cellules dans une cuvette à électroporation avec 20μg du vecteur de ciblage préalablement linéarisé, le tout ne devant pas excéder les 900μL. La cuvette est ensuite mise dans l'électroporateur (BioRad Gene Pulser Xcell) et un choc électrique (240V, 500μF et environ 6ms) est délivré dans la cuvette. La cuvette est laissée 10 à 20min à température ambiante avant que son contenu soit repris avec 2mL de milieu pour cellule ES contenant du LIF et réparti sur 2 boîtes de 10cm avec des fibroblastes mitomycinés. Le lendemain le milieu est changé, et deux jours après l'électroporation la sélection est commencée.

### **Sélection des cellules ES recombinantes**

Elle s'effectue par l'ajout de G418 à 200μg/mL et de Gancyclovir à 2μM dans le milieu de culture pour cellules ES. Le G418 ou Généticine va permettre une sélection positive des

clones ayant intégré la cassette de résistance à la Néomycine, le Gancyclovir est un analogue du dGTP qui sera incorporé à l'ADN en présence de la cassette TK (thymidine kinase), provoquant alors l'arrêt de sa réplication et une sélection négative des cellules ayant intégré cette cassette. Ce milieu de sélection est changé tous les jours durant 6 à 8 jours au bout desquels il ne reste plus que des colonies résistantes sur les boîtes.

### **Amplification des clones de cellules ES résistants**

Les clones de cellules ES résistants au G418 et au Gancyclovir, sont repiqués sur des plaques 96 puits avec des fibroblastes mitomycinés. Ils seront amplifiés, divisés et synchronisés afin d'obtenir les clones en triplicats, deux seront congelés sur plaques 96 puits, le troisième servant à l'amplification. Elle s'effectue par une augmentation progressive de la taille des puits où ils sont cultivés afin d'obtenir une quantité de cellule suffisante pour la réalisation d'un crible permettant de vérifier l'évènement de recombinaison ayant eu lieu dans ces cellules.

### **Microinjection des cellules ES recombinantes en blastocyste**

Quinze cellules ES recombinantes sont microinjectées par blastocyste. Les blastocystes sont ensuite implantés dans une femelle pseudo-gestante.

## **2.2.2 Cultures de cellules myoblastiques C2C12**

Pour réaliser une cinétique de fusion/différenciation, les cellules C2C12 sontensemencées, après amplification, à une densité de 5 000 cellules/cm<sup>2</sup> sur des boîtes de 100mm pour extraire les ARN qui serviront à une étude d'expression, et de 60mm pour la réalisation de la courbe de fusion. Leur culture comprend deux étapes, tout d'abord une phase de prolifération de 48h puis une phase de différenciation qui dure 14 jours. La différenciation est induite par le remplacement du milieu riche en sérum (DMEM, 10% sérum de veau foetal, 2% L-Glutamine, 5 000U Pénicilline/5mg Streptomycine) par un milieu pauvre en sérum (DMEM, 2% sérum de cheval, 2% L-Glutamine, 5 000U Pénicilline/5mg Streptomycine).



**Etude de fusion**

A partir de 24h de différenciation, puis toutes les 24h, une boîte est lavée deux fois au PBS, fixée pendant 15min avec du PFA 4%, à nouveau lavée deux fois au PBS puis déshydratée dans de l'éthanol 70% à 4°C pendant au moins 12h.

Lors de la coloration, l'éthanol est éliminé par deux rinçages avec du PBS puis les cellules sont mises en contact avec de l'hématoxyline Shandon Harris (*Thermo scientific*) pendant 10min afin de colorer les noyaux en bleu foncé. Après trois rinçages avec du PBS, le cytoplasme est coloré en rose pendant 10min dans de l'éosine Y Shandon (*Thermo scientific*). Après trois nouveaux rinçages avec du PBS les cellules sont recouvertes d'un mélange PBS/glycérol 10%.

L'observation des cellules se fait au grossissement de X400 et les noyaux des cellules sont comptés dans 12 champs. Le rapport entre le nombre de noyaux contenus dans les myotubes et le nombre total de noyaux donne le pourcentage de fusion.

**Etude d'expression**

Elle s'effectue grâce à la technologie TaqMan® à partir des ARN totaux extraits à différents temps de la cinétique

**Transfection des cellules C2C12**

Elle s'effectue grâce à du Fugene6 Transfection Reagent (*Roche* 11 814 443 001) qui est un agent non liposomal formant un complexe avec l'ADN et permettant ainsi son incorporation dans les cellules C2C12. Les cellules sont trypsinées et réensemencées à une concentration de 5000 cellules/cm<sup>2</sup>. La transfection a lieu durant la phase de prolifération, 48h avant le passage en phase de différenciation.

Le Fugene6 est utilisé en accord avec les recommandations du fournisseur. Pour une boîte de 35mm, 9µL de Fugene6 sont ajoutés à 2µg du plasmide à transférer dans un volume final de 100µL de DMEM et incubés 45min à température ambiante puis ajoutés aux cellules. Le milieu est changé 24h après.



### 3 Résultats

#### 3.1 Etude des domaines d'expression de *Gasp1* par hybridation *in situ* sur embryon murin *in toto*

##### 3.1.1 Mise au point d'une sonde ARN anti sens *Gasp1*

Aucune sonde pour hybridation *in situ* sur embryon murin *in toto* n'a pour l'instant été créée, d'où la nécessité de réaliser et caractériser une sonde utilisable pour cette méthode.

Nous avons réalisé et testé plusieurs sondes ARN anti-sens ; en général elles sont sélectionnées dans la partie 3'UTR du gène, cependant cette région du gène n'était pas connue lors de la synthèse de ces sondes. L'exon 1 étant trop court, les sondes ont été sélectionnées au sein de l'exon 2 (Figure 23). Trois sondes ont été dessinées puis testées car la spécificité varie suivant la position et la taille de la sonde.

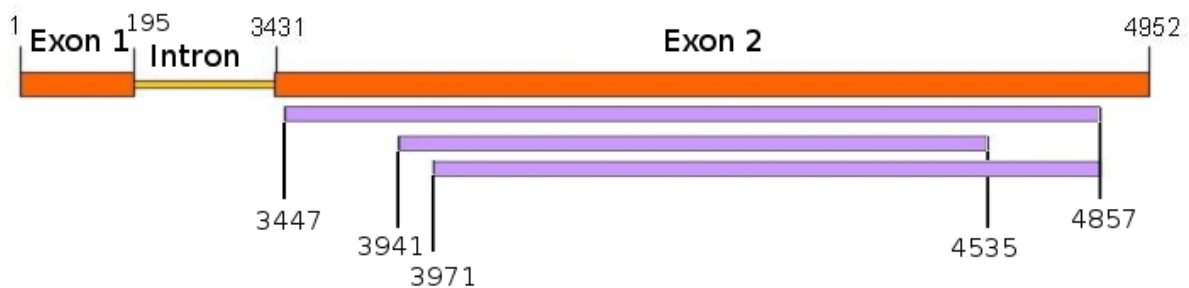


Figure 23 : Sonde ARN anti-sens *Gasp1* testées. Elles se situent dans l'exon 2 et font, de haut en bas, 1 410, 595, 897pb.

Les tests réalisés nous ont permis de retenir la sonde de 595pb se situant au milieu de l'exon 2. Elle permet la visualisation des domaines d'expression de *Gasp1* avec le meilleur rapport signal/bruit.

##### 3.1.2 Domaine d'expression de *Gasp1*

Nous avons visualisé les domaines d'expression de *Gasp1* entre 9,5 et 12,5 jpc (Figure 24). A 9,5 jpc, *Gasp1* s'exprime au niveau du tube neural. A 10,5 jpc, l'expression est détectée au niveau du tube neural et au niveau du bourgeon des membres. A 11,5 jpc, l'expression se situe au niveau du tube neural, dans la partie caudale de l'embryon, et au niveau des membres

l'expression s'étend sur l'axe proximo-distal. A 12,5 jpc, l'expression est au niveau de la partie caudale, des membres et du bourgeon génital.

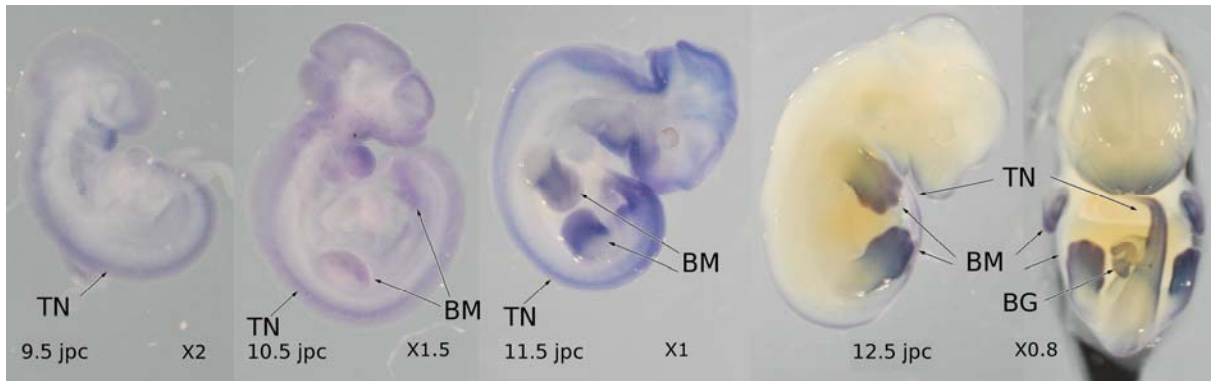


Figure 24 : Domaines d'expression de *Gasp1* de 9,5 à 12,5 jpc. De 9,5 à 12,5 jpc, *Gasp1* s'exprime au niveau du tube neural. De 10,5 à 12,5 jpc, il s'exprime au niveau du bourgeon des membres. A 12,5 jpc, il s'exprime au niveau du bourgeon génital. TN : tube neural, BM : bourgeon des membres, BG : bourgeon génital.

Au niveau des membres, *Gasp1* s'exprime dans les régions antérieures et postérieures du bourgeon à 11,5 jpc. A 12,5 jpc cette expression s'étend aux zones de condensations précartilagineuses qui donneront naissance aux doigts (Figure 25).

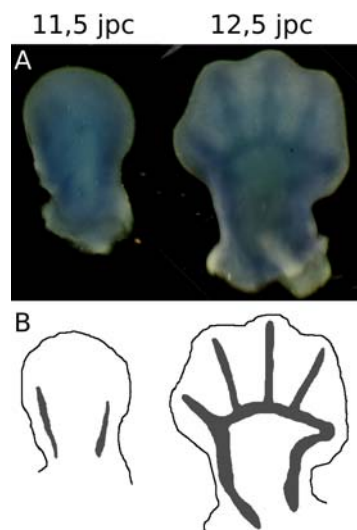


Figure 25 : Domaines d'expression de *Gasp1* au niveau des membres, à 11,5 et 12,5 jpc. **A)** *Gasp1* s'exprime au niveau des condensations précartilagineuses. **B)** Schéma de l'expression de *Gasp1*.

### 3.1.3 Comparaison avec l'expression de *Gdf8*

La réalisation d'hybridation *in situ* sur embryon entier avec une sonde pour *Gdf8* nous permettra de comparer ces domaines d'expression avec ceux obtenus précédemment pour *Gasp1*.

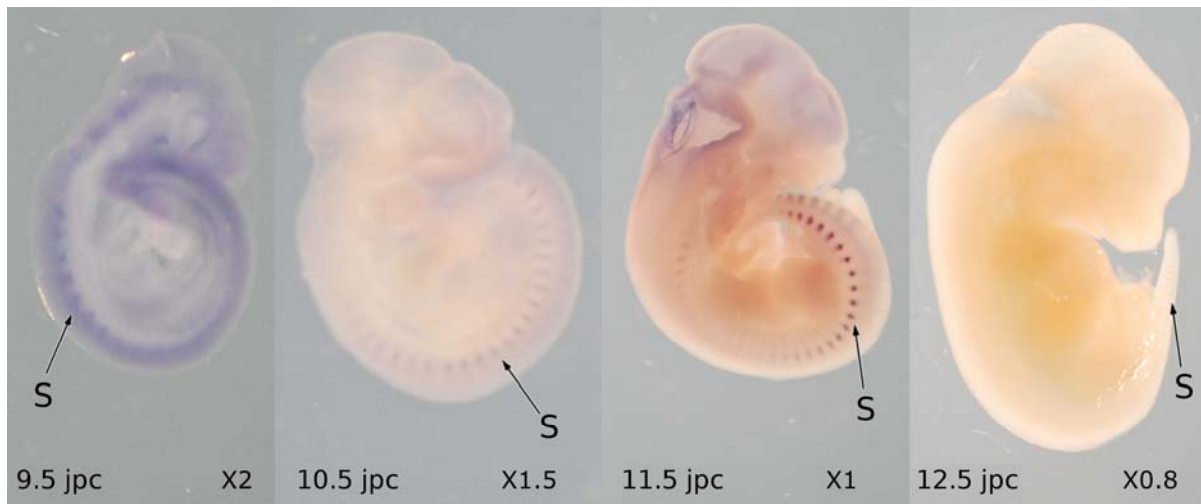


Figure 26 : Domaine d'expression de *Gdf8* de 9,5 jpc à 12,5 jpc. De 9,5 à 12,5 jpc, *Gdf8* s'exprime au niveau des somites. S : somites.

De 9,5 à 12,5 jpc l'expression de *Gdf8* est limitée aux somites jeunes (Figure 26). L'expression, qui se situe en position dorsale à 9,5 jpc, progresse sur l'axe rostro-caudale pour ne plus être que faiblement présente à l'extrémité caudale à 12,5 jpc. Ses domaines d'expression sont différents de ceux de *Gasp1*.

Nous avons également analysé l'influence de *Gdf8* sur l'expression de *Gasp1* par la réalisation d'hybridation *in situ* sur des embryons sauvages ou KO (hétérozygote ou homozygote) pour *Gdf8* (Figure 27). La localisation tout comme l'intensité des domaines d'expression ne varient pas pour un âge donné quelque soit le génotype des embryons. Les domaines visualisés correspondent à ceux obtenus précédemment sur des embryons sauvages.

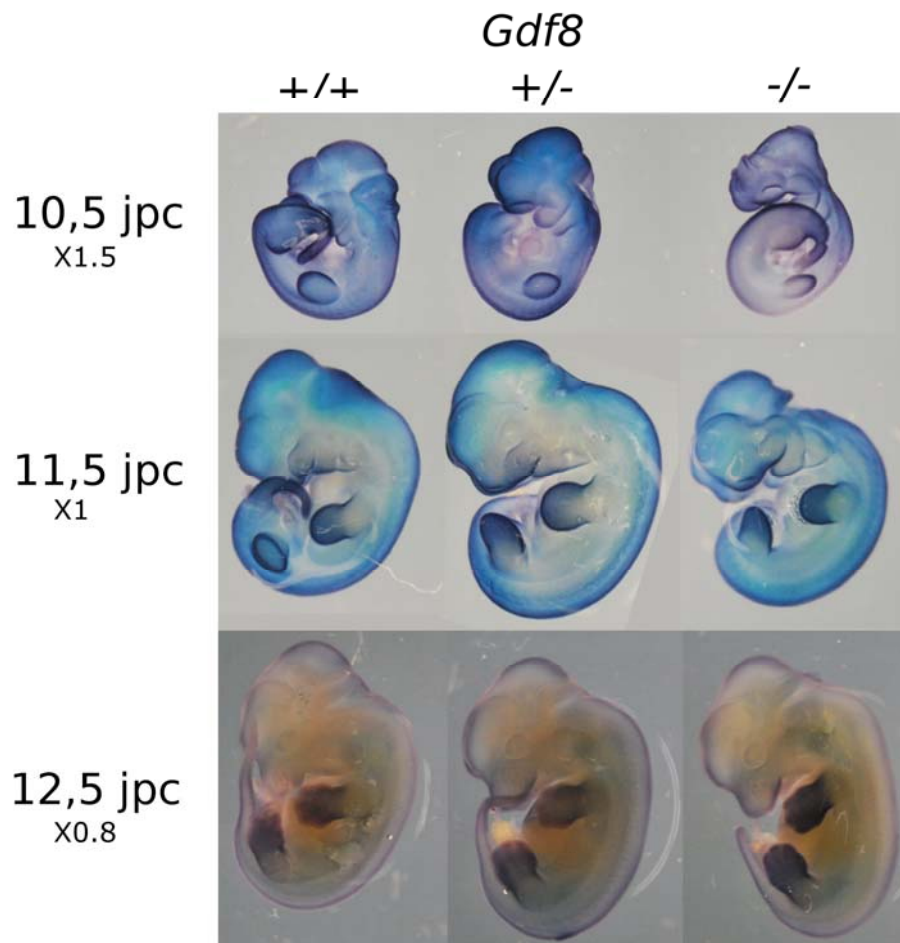


Figure 27 : Domaines d'expressions de *Gasp1* en fonction du génotype de *Gdf8*. Pour *Gdf8* +/+, +/-, -/- de 10,5 à 12,5 jpc les domaines d'expression de *Gasp1* sont le tube neural, les bourgeons des membres et le bourgeon génital.

## 3.2 Etude *in vitro* : Expression de *Gasp1* et des gènes myogéniques lors de la fusion et de la différenciation des myoblastes

### 3.2.1 Le modèle cellulaire C2C12

La lignée de cellules myoblastique C2 a été isolée en 1977 par Yaffe et coll. à partir de myoblastes murins (lignée C3H). A l'état de cellules mononuclées, le temps de génération est de 24h et lorsque les cellules arrivent à confluence, elles commencent à fusionner. Ainsi quelques jours après le début de la fusion, un réseau dense de fibres multinucléées est observé, le maximum de fusion atteint est entre 50 et 60%. L'utilisation d'un milieu appauvri en sérum permet une augmentation de la formation des fibres. Quelques jours après le début

de la fusion les cellules sont capables de se contracter, la force de ces contractions peut provoquer le décollement des cellules. De plus, la formation de fibres multinucléées est associée à une augmentation de l'activité créatine kinase en comparaison de celle observée dans les cellules mononucléées (Yaffe *et al.*, 1977).

### 3.2.2 Caractérisation du modèle cellulaire C2C12

Elle est faite par l'observation de la fusion des myoblastes puis par l'analyse de l'expression de différents gènes intervenants au cours du processus de différenciation des myoblastes en myotubes. Cela permet de connaître le comportement de notre modèle par rapport aux conditions de culture utilisées et aux données de la littérature.

La courbe de fusion (Figure 28) atteint le maximum de fusion (environ 50%) 168 heures après la mise en différenciation des cellules ce qui correspond aux données de la littérature (Yaffe et Saxel, 1977 ; Boone Miller *et al.*, 1990).

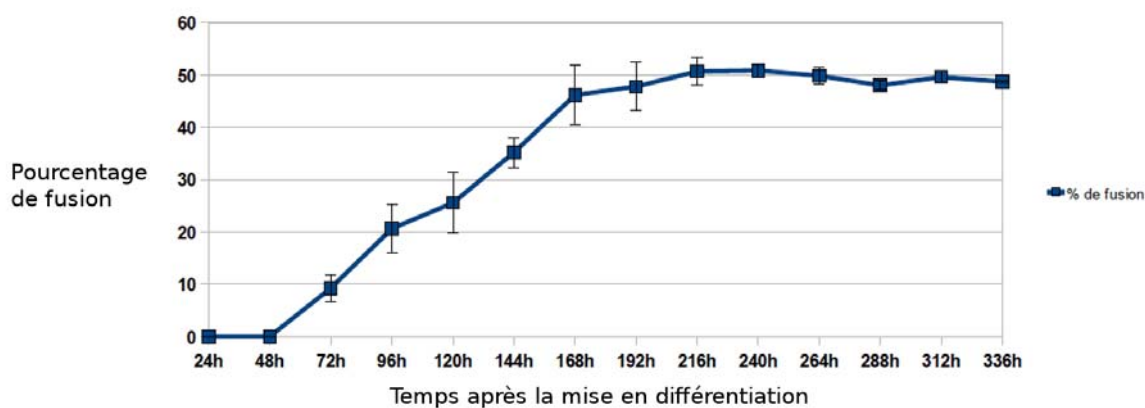


Figure 28 : Courbe de fusion des C2C12. A partir de 72h les myoblastes commencent à fusionner, le maximum de fusion, qui se situe à environ 50%, est atteint à 168h. Cela indique une fusion normale. Le pourcentage de fusion est obtenu grâce à trois cinétiques différentes. Les barres verticales représentent les écarts moyens.

La différenciation des myoblastes passe par leur alignement et leur allongement avant qu'ils fusionnent pour donner des myotubes (Figure39).

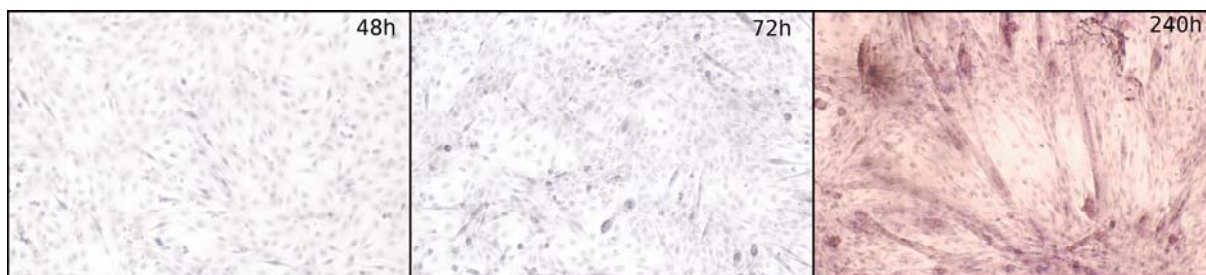


Figure 29 : Photographie des cellules C2C12 à différents stades de fusion. A 48h les cellules s'alignent et s'allongent, à 72h les cellules ont fusionné à 10%, 50% à 240h. Grossissement X100.

Pour l'étude de l'expression des gènes impliqués lors de la fusion des myoblastes l'intervalle compris entre 0,5 et 2 pour la quantité relative (zone en gris) correspond à l'espace où de manière arbitraire les variations des gènes ne sont pas prises en considération, au-dessus le gène est surexprimé alors qu'en-dessous il est sous exprimé. Les points isolés, à la limite de cet intervalle 0,5 – 2 ne sont pas considérés comme significatifs en raison du manque de données permettant de valider la significativité statistique de telles variations. Ces valeurs sont exprimées avec une échelle Logarithmique, une valeur en échelle linéaire est donnée entre parenthèses.

Au cours de la cinétique la *Myogénine* (Figure 30) est sous exprimé d'un facteur d'environ 0,1 (sous expression d'un facteur -10) durant la phase de prolifération, puis son expression augmente tout au long du processus de fusion des myoblastes pour atteindre un facteur de surexpression de 350 à environ 60h et se stabilise jusqu'à la fin de la cinétique.

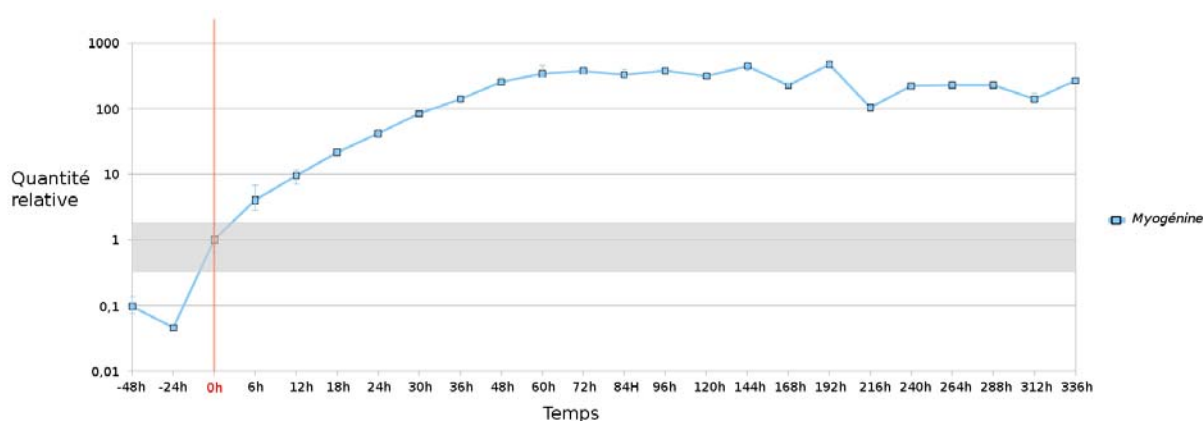


Figure 30 : Expression de la *Myogénine* lors de la prolifération et de la fusion des C2C12. La courbe représente la moyenne de triplicats issus de trois cinétiques différentes. Les barres verticales représentent l'écart-type. *Gapdh*, *Dffa* et  $\beta$ -2-microglobuline sont utilisés comme gènes de référence et les courbes sont normalisées à 0h.



L'expression de *MyoD* (Figure 31) ne subit pas de variation importante pendant la durée de la cinétique.

*Myf5* (Figure 31) ne subit pas de variation importante de son expression jusqu'au début de la fusion (environ 60h) puis elle diminue et se stabilise en fin de fusion à un facteur de sous expression de 0,2 (sous expression d'un facteur -5).

*MRF4* (Figure 31) est sous exprimé d'un facteur 0,25 (sous expression d'un facteur -4) durant la phase de prolifération. L'expression ne subit pas de variation importante jusqu'à 120h, ce qui correspond à environ 25% de fusion. Ensuite elle augmente jusqu'à un facteur de surexpression de 5. Les valeurs pour les temps entre -48h et 84h peuvent être discutés du fait d'un Ct élevé (supérieur à 33) et de la dispersion des réplicats.

*Pax3* (Figure 31) est sous exprimé d'un facteur 0,4 (sous expression d'un facteur -2,5) pendant la prolifération. L'expression ne varie pas de façon importante au début de la phase de différenciation jusqu'à environ 30h, puis elle diminue au cours de la fusion et se stabilise à un facteur de 0,1 (sous expression d'un facteur -10). Les valeurs pour les temps de -48h et entre 48 et 336h peuvent être discutées du fait d'un Ct élevé (supérieur à 33) et de la dispersion des réplicats.

L'expression de *Pax7* (Figure 31) ne subit pas de variation importante au cours de la phase de prolifération jusqu'au début de la phase de différenciation (environ 96h). Elle diminue durant la fusion des myoblastes et se stabilise à un facteur de sous expression de 0,45 (facteur de sous expression de -2,2).

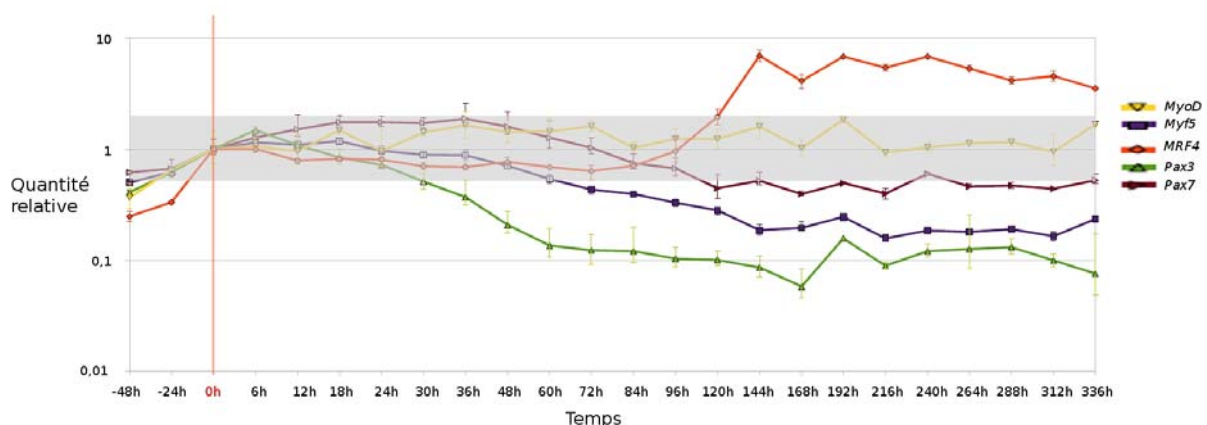


Figure 31 : Expression de *MyoD*, *Myf5*, *MRF4*, *Pax3* et *Pax7* lors de la prolifération et de la fusion des C2C12. Les courbes représentent la moyenne de triplicats issus de trois cinétiques différentes. Les barres verticales représentent l'écart-type. *Gapdh*, *Dffa* et  $\beta$ -2-microglobuline sont utilisés comme gènes de référence et les courbes sont normalisées à 0h.

### 3.2.3 Etude de l'expression de *Gasp1* et *Gdf8* au sein de ce modèle

*Gasp1* (Figure 32) ne présente pas de variation importante de son expression (variation inférieure à un facteur de  $\pm 2$ ) au cours de la cinétique de différenciation des cellules C2C12.

*Gdf8* (Figure 32) est sous exprimé d'un facteur 0,25 (sous expression d'un facteur -4) durant la phase de prolifération (de -48h à -24h). Puis l'expression augmente au début de la différenciation et passe un seuil avec l'apparition des premiers myotubes. L'augmentation atteint un maximum, avec une augmentation de son expression comprise entre 15 et 20, à environ 72h et dure jusqu'à 144h où la fusion est au trois quarts de son maximum. L'expression va ensuite diminuer pour revenir et se stabiliser à un facteur de surexpression de 2,5. Les valeurs pour les temps entre -48h et 30h ainsi qu'entre 240 et 336h peuvent être discuté du fait de sa très faible expression qui entraine un Ct élevé (supérieur à 33) et de la dispersion des réplicats.

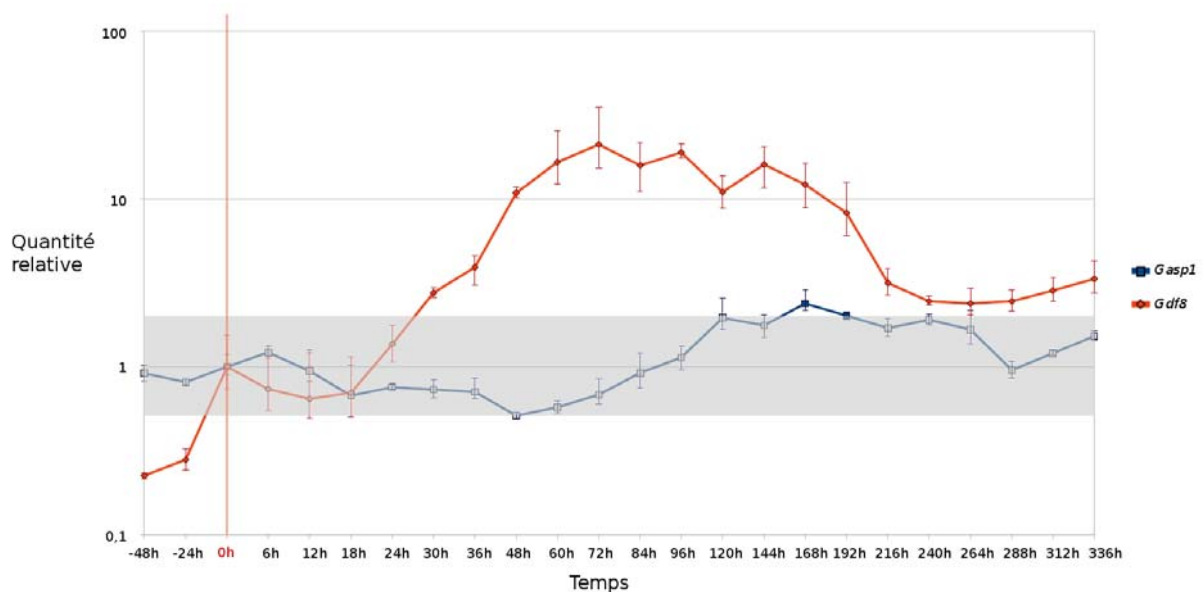


Figure 32 : Expression de *Gasp1* et *Gdf8* lors de la prolifération et de la fusion des C2C12. Les courbes représentent la moyenne de triplicats issus de trois cinétiques différentes. Les barres verticales représentent l'écart-type. *Gapdh*, *Dffa* et  $\beta$ -2-microglobuline sont utilisés comme gènes de référence et les courbes sont normalisées à 0h.

### 3.2.4 Conséquences de la surexpression de *Gasp1*

L'étude de la surexpression de *Gasp1* a été faite au sein de la lignée de myoblastique murine C2C12. Une partie des cellules a été transfectée avec un vecteur permettant la surexpression

de *Gasp1* (lignée SurGasp), le reste servant de contrôle a été pour une partie transfectée avec un vecteur «contrôle» (lignée Contrôle), l'autre partie n'ayant pas subi de transfection (lignée NT).

### Effet sur la fusion des myoblastes

L'étude des conséquences de la surexpression de *Gasp1* a d'abord été faite au niveau de la fusion des myoblastes (Figure 33), permettant d'observer les conséquences au niveau du pourcentage maximum de fusion et de la vitesse à laquelle elle s'effectue.

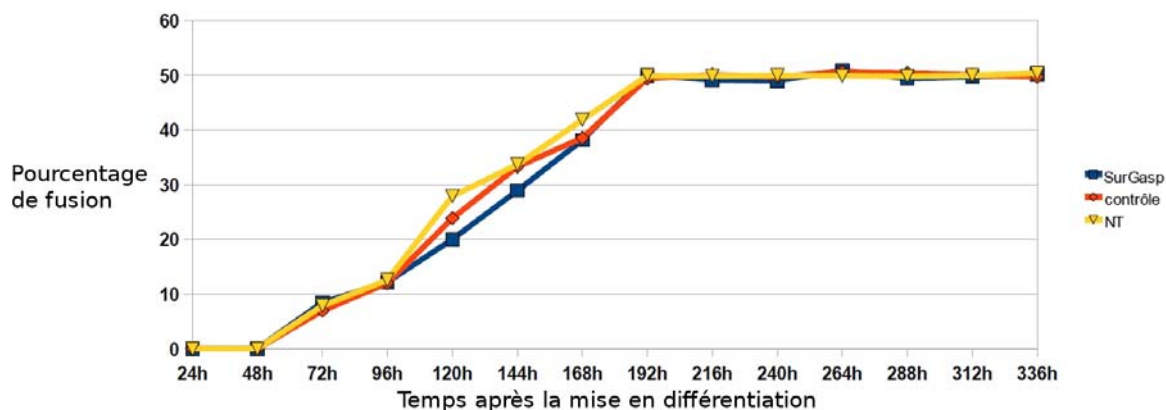


Figure 33 : Effet de la surexpression de *Gasp1* sur la fusion des myoblastes en myotubes. Le profil de fusion des C2C12 est similaire entre les trois lignées étudiées, la fusion progresse de façon comparable et le maximum de fusion est atteint de manière identique pour les différentes conditions.

La vitesse de fusion entre les différentes conditions subit des variations (à 120h le pourcentage de fusion est compris entre 20 et 30%) mais reste comparable (Figure 36). Le maximum de fusion, pour les différentes conditions, atteint 50% au huitième jour. La fusion des myoblastes s'effectue normalement, aucune différence n'est visible au niveau de leur morphologie (Figure 34).

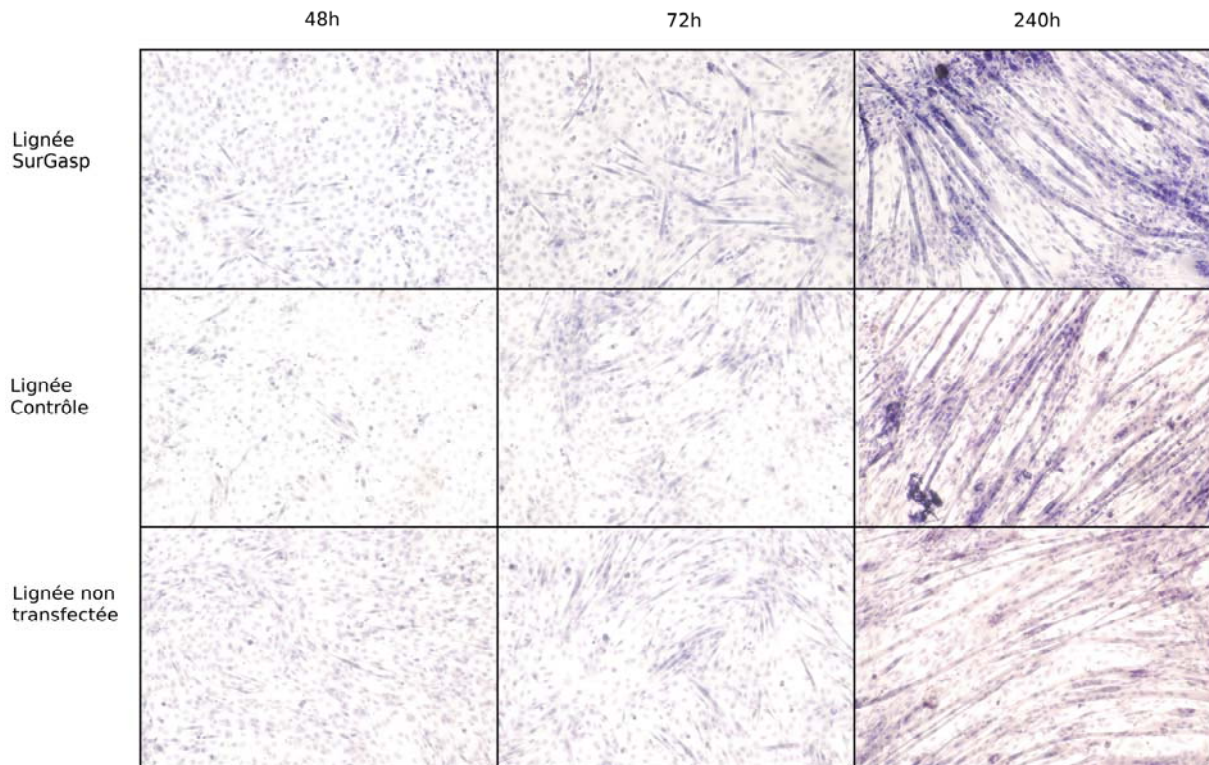


Figure 34 : Photographie des cellules C2C12 à différents stades de fusion, pour les lignées SurGasp, Contrôle et non transfectée. A 48h les cellules s'alignent et s'allongent, à 72h les cellules ont fusionné à 10%, 50% à 240h. Grossissement X100.

### Etude de l'expression des gènes précédemment analysés lors de la surexpression de *Gasp1*

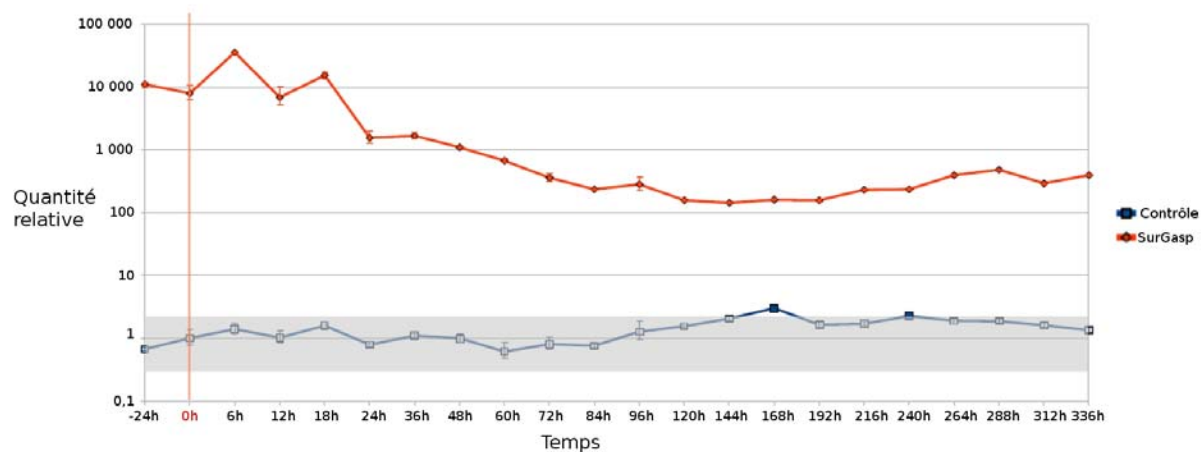
Cette étude permet d'analyser les conséquences provoquées par la surexpression de *Gasp1* au niveau de l'expression de *Gdf8*, des *MRF*, de *Pax3* et *Pax7*.

Au cours de la cinétique, pour la lignée Contrôle, l'expression de *Gasp1* (Figure 35A) ne subit pas de variation importante.

Pour la lignée surexprimant *Gasp1*, nommée SurGasp, il est surexprimé d'un facteur 10 000 lors de la phase de prolifération et pendant les 18 premières heures de la phase de différenciation. Un facteur 10 de surexpression est perdu durant le début de la fusion des myoblastes jusqu'à 48h environ où le facteur de surexpression est de 1000. Au cours de la fusion, un facteur 10 de surexpression est à nouveau perdu et la surexpression de *Gasp1* se stabilise à un facteur de surexpression de 200 qui perdure jusqu'à la fin de la cinétique.

Au cours de la cinétique de différenciation, les expressions de *Gdf8* (Figure 35B), des *MRF* (Figure 36-37) ainsi que de *Pax3* et *Pax7* (Figure 38) au sein de la lignée Contrôle et de la lignée SurGasp sont similaires à celles observées lors de la caractérisation du modèle C2C12.

A)



B)

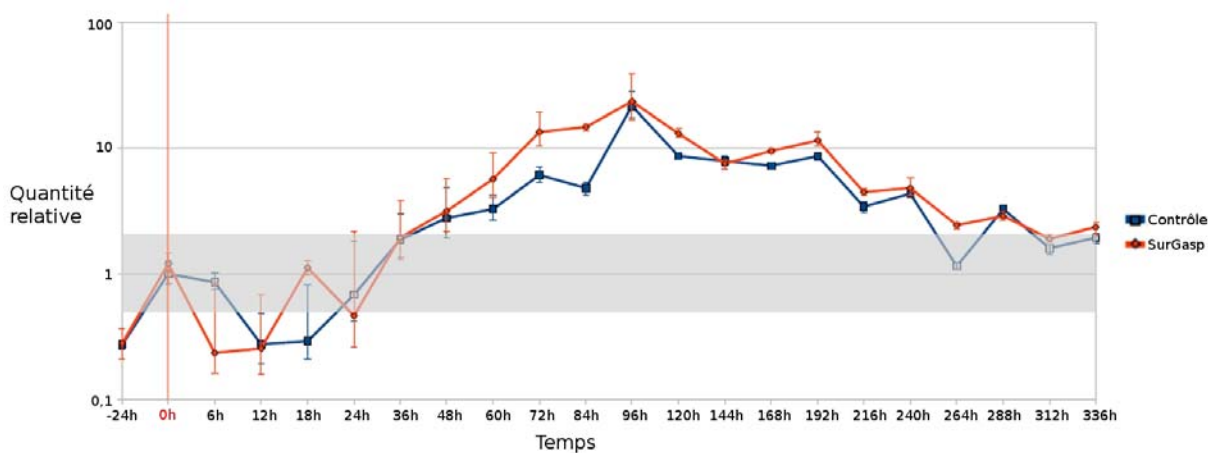
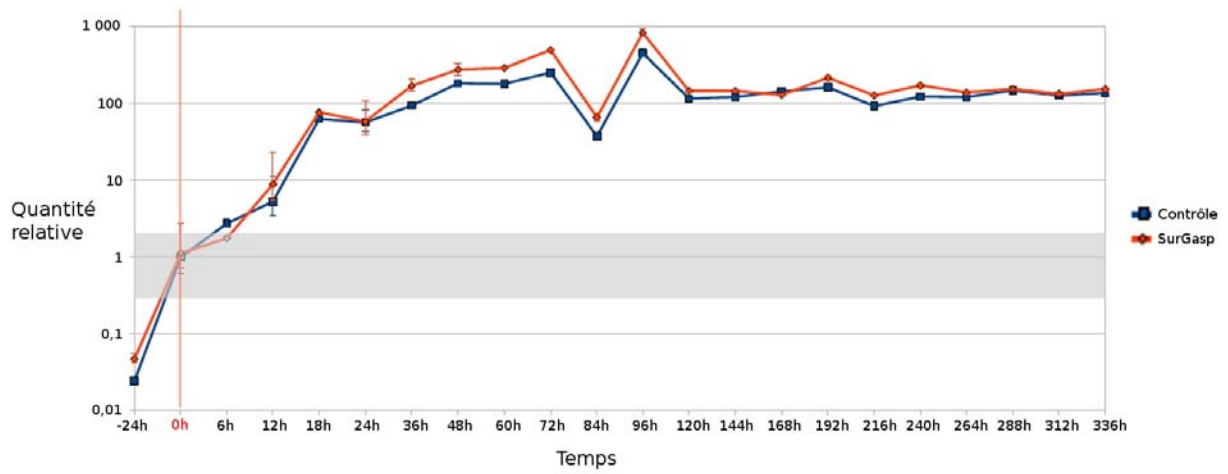


Figure 35: Expression de *Gsp1* (A) et *Gdf8* (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp. *Gapdh*, *Dffa* et la  $\beta$ -2-microglobuline sont utilisés comme gènes de référence.

A)



B)

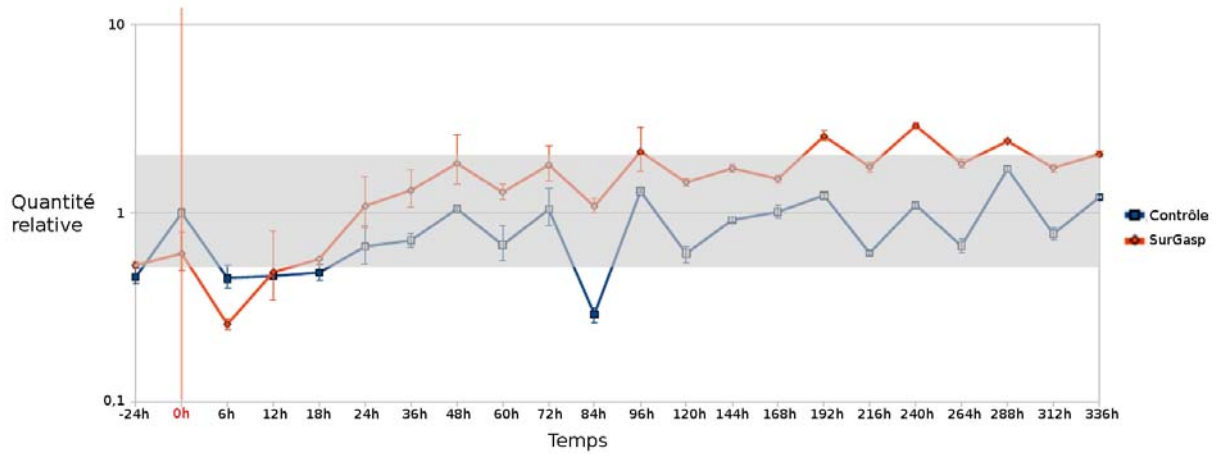
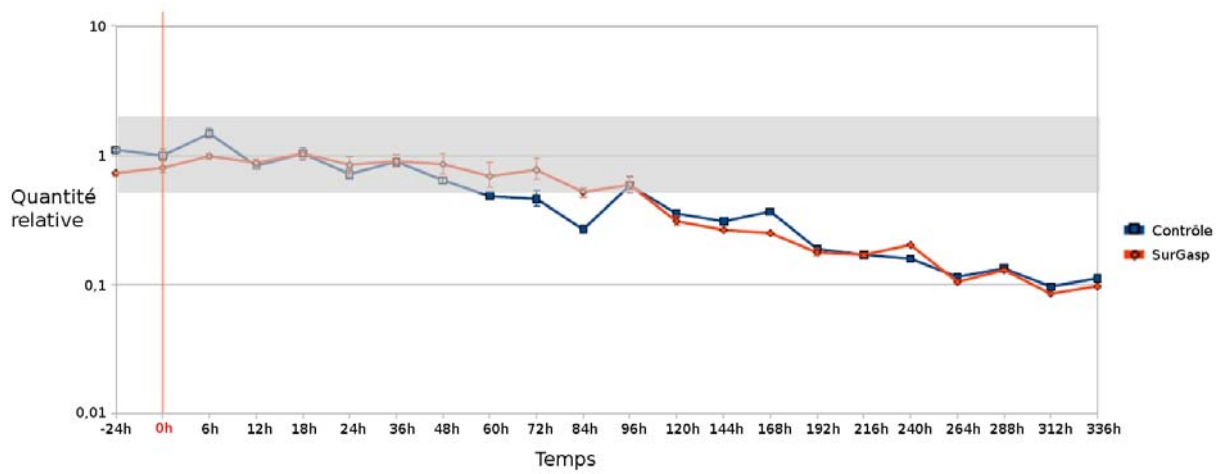


Figure 36: Expression de la *Myogénine* (A) et de *MyoD* (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp. *Gapdh*, *Dffa* et la  $\beta$ -2-microglobuline sont utilisés comme gènes de référence.

A)



B)

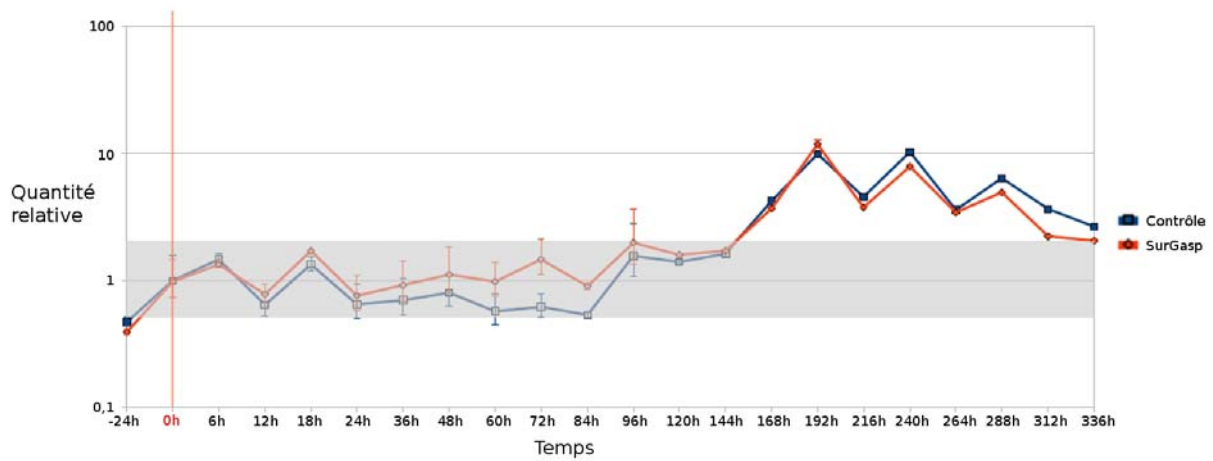
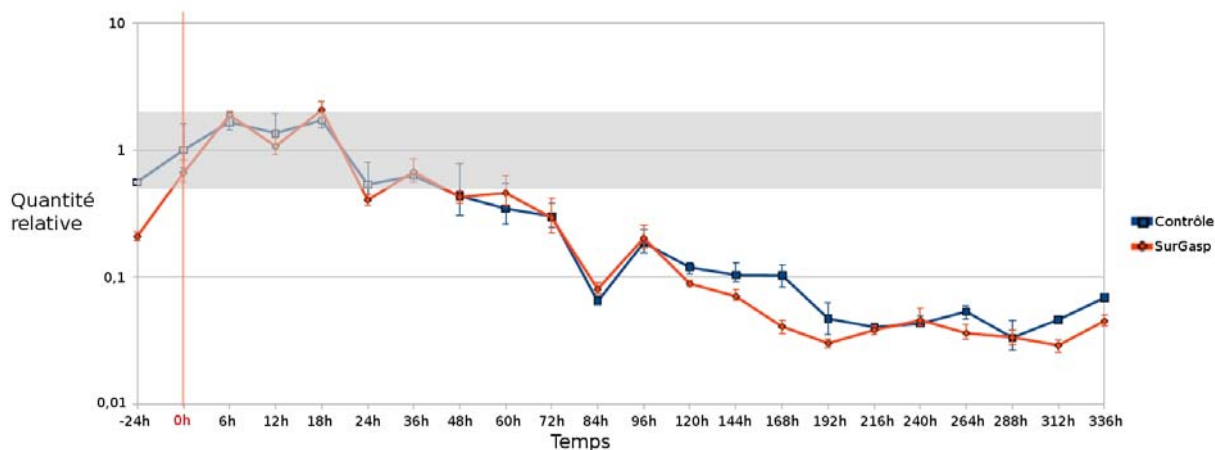


Figure 37: Expression de *Myf5* (A) et *MRF4* (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp. *Gapdh*, *Dffa* et la  $\beta$ -2-microglobuline sont utilisés comme gènes de référence.

A)



B)

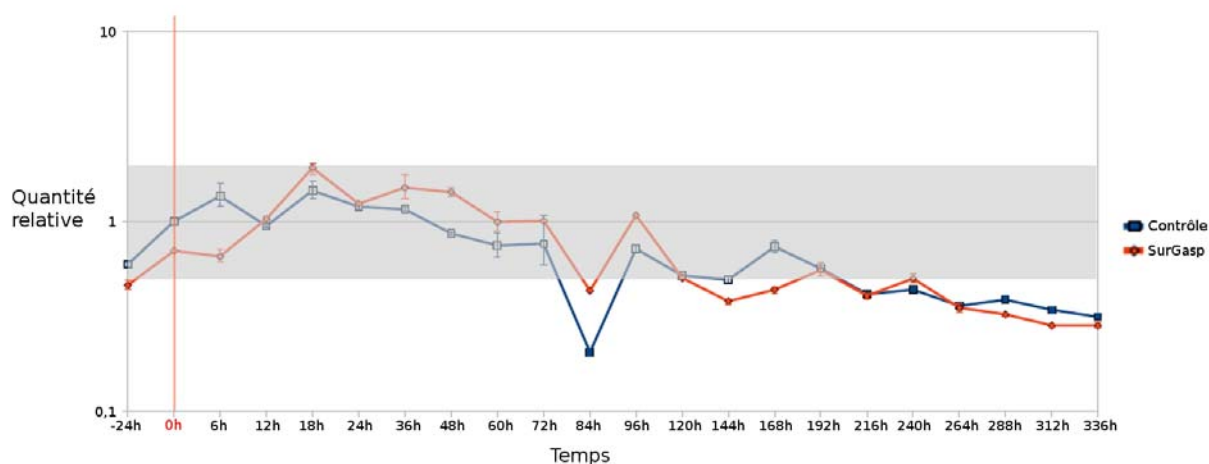


Figure 38: Expression de *Pax3* (A) et *Pax7* (B) au sein des lignées Contrôle et SurGasp. *Gapdh*, *Dffa* et la  $\beta$ -2-microglobuline sont utilisés comme gènes de référence.

### 3.3 Etude *in vivo* : Réalisation d'un modèle murin *Gasp1* KO

La réalisation d'un modèle murin KO par recombinaison homologue en cellules souche embryonnaires (ES) pour *Gasp1* permettra l'étude de sa fonction *in vivo*. La réalisation d'un tel modèle comprend plusieurs étapes : la construction du vecteur de recombinaison homologue, l'intégration du vecteur en cellules ES, la sélection des clones de cellules recombinantes et la micro-injection des cellules ES recombinantes dans des blastocystes de souris sauvages afin d'obtenir des souris chimères et d'établir une lignée murine KO.



### 3.3.1 Construction du vecteur de ciblage

Le travail de construction de ce vecteur a été initié par Christelle Vincent (M2R, 2006).

L'inactivation d'un gène par recombinaison homologue dans les cellules ES consiste au remplacement d'un allèle de type sauvage par un allèle muté. Pour cela, nous avons inséré le gène d'intérêt qui possède la mutation désirée dans un vecteur de clonage ainsi que différentes cassettes de sélection. Elles permettront de sélectionner les cellules ES recombinantes. La stratégie utilisée pour la construction du vecteur de ciblage comprend plusieurs étapes (Figure 39).

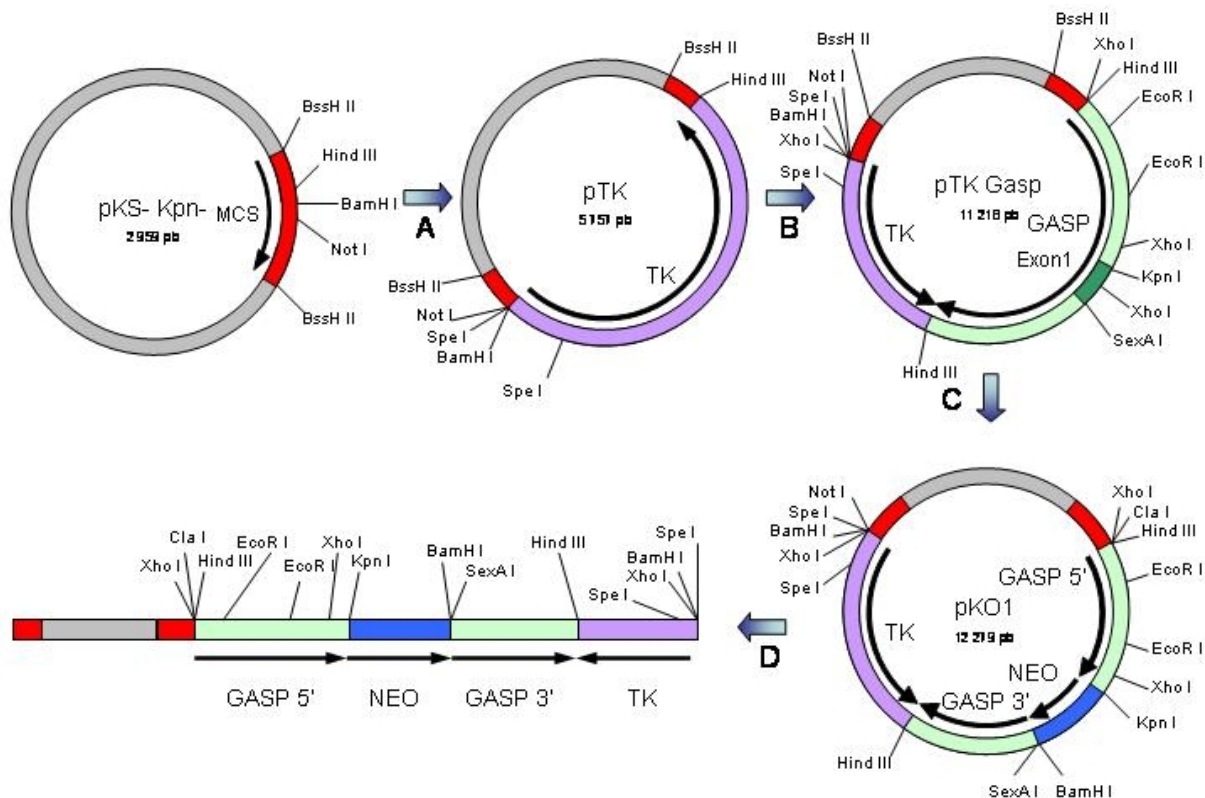


Figure 39 : Stratégie de la réalisation du KO de *Gasp1*

**A)** Intégration de la cassette TK (Thymidine Kinase) ; **B)** Clonage de *Gasp1* ; **C)** Insertion de la cassette Néo ; **D)** Linéarisation du vecteur de ciblage par digestion avec l'enzyme de restriction NotI

Le vecteur pKO1 possède le gène de résistance à la néomycine. En présence de cet antibiotique, seuls les clones ayant intégré ce vecteur sont résistants (sélection positive). En parallèle, une deuxième sélection est effectuée avec du Gancyclovir. Les clones n'ayant pas effectué la recombinaison homologue posséderont encore la cassette TK ce qui les rendra sensibles à l'action de Gancyclovir (sélection négative).

En premier, la cassette TK a été clonée dans un vecteur plasmidique qui a été nommé pTK (Figure 39A). Puis, l'exon 1 de *Gasp1* ainsi que les séquences en 5' et 3' servant de bras d'homologie (environ 1 000pb chacune) ont été ajoutés dans le pTK permettant l'obtention du vecteur pTKGASP (Figure 39B). Finalement, l'exon 1 de *Gasp1* a été remplacé par la cassette NEO donnant le vecteur de ciblage pKO1 (Figure 39C).

Le vecteur a été vérifié par une série de digestion enzymatique (Figure 40) ainsi que par séquençage aux points de jonction.

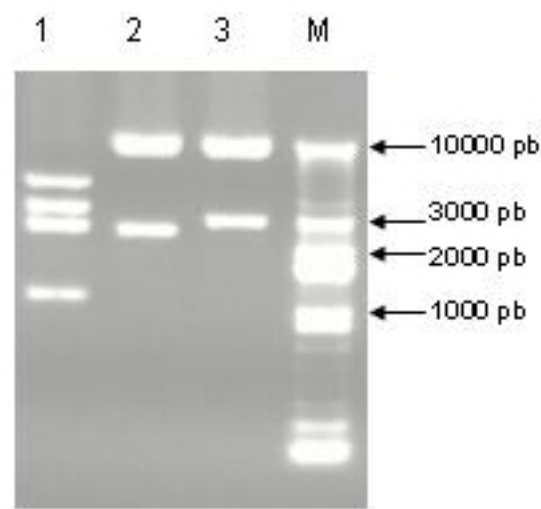


Figure 40 : Vérification de l'intégration de Néo dans pTKGASP.

Digestion par BamHI/EcoRI (piste 1), ClaI/KpnI (piste 2) et ClaI/NotI (piste 3).

### 3.3.2 Recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (ES)

Les sondes utilisées pour cribler les cellules ES se situent hors des bras d'homologie du vecteur de recombinaison et permettront après digestion enzymatique de distinguer l'allèle sauvage de l'allèle recombinant. En effet, l'introduction de sites de restriction supplémentaires (SphI) dans l'allèle muté créera une différence de taille de bande après digestion (Figure 41).

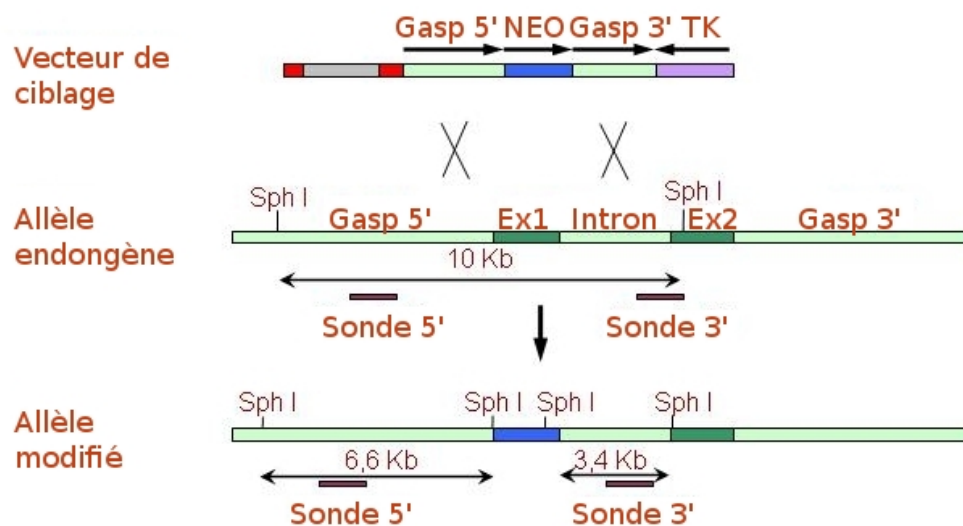


Figure 41 : Recombinaison homologue et criblage des cellules ES résistantes. Lorsque la recombinaison homologue s'effectue correctement le remplacement de l'exon 1 de *Gasp1* par la cassette de résistance à la néomycine introduit deux nouveaux sites de restriction *SphI*. Ces nouveaux sites permettent, après digestion enzymatique, de distinguer l'allèle endogène, pour laquelle les sondes 5' et 3' permettront de visualiser une bande de 10kb, de l'allèle modifié pour laquelle les sondes 5' et 3' permettront de visualiser respectivement une bande de 6,6kb et 3,4kb.

#### Electroporations

La première et la deuxième électroporation (Tableau 5) ont été réalisées avec 20µg du vecteur pKO1 linéarisé par *NotI* (Figure 40D) dans des cellules ES E14 (129 Sv/Ola). Pour la première, nous avons pu repiquer et amplifier 480 clones résistants. Leur criblage par les sondes 5' et 3' (Figure 42), nous a permis d'identifier 23 clones simple recombinant mais aucun ne

s'est avéré être double recombinant. Pour la deuxième, nous avons repiqué 384 clones résistants et 227 clones ont pu être amplifiés et criblés. Leur crible a permis d'identifier un clone simple recombinant mais pas double recombinant.

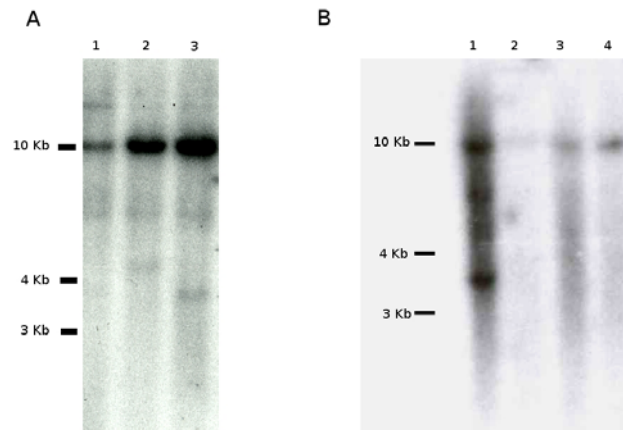


Figure 42 : Crible des clones ES par Southern blot avec la sonde Gasp 3'. **A)** La bande à 10 Kb correspond à l'allèle sauvage. Les autres bandes des pistes 1, 2 et 3 correspondent à des insertions aléatoires du transgène. **B)** L'allèle sauvage correspond à la bande située à 10 Kb. Piste 1 : la bande à environ 3,5Kb correspond à l'allèle recombinant, les bandes entre 10 et 4 Kb sont dues à la digestion partielle. Piste 2, 3 et 4 : seul l'allèle sauvage peut être observé.

La troisième électroporation (Tableau 5) a été réalisée avec 20 $\mu$ g du vecteur pKO1 linéarisé par SspI dans des cellules ES E14 (129 Sv/Ola). SspI est la seule autre enzyme utilisable pour linéariser le vecteur de recombinaison homologue. Nous avons amplifié et criblé 187 clones résistants. Leur crible a permis d'identifier 8 clones simple recombinant dont un double recombinant. Nous avons vérifié ce clone par Southern Blot (Figure 43) ainsi que par séquençage de fragments amplifiés par PCR (Annexe 1). Ces fragments sont amplifiés grâce à une amorce se situant hors des bras d'homologie et l'autre dans la cassette de résistance à la néomycine.

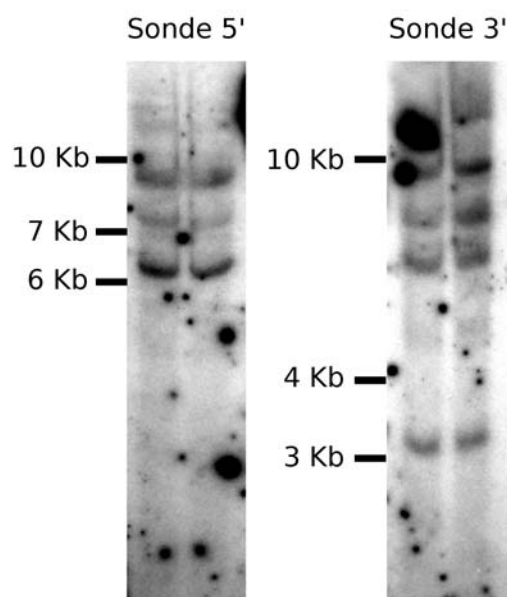


Figure 43 : Vérification par Southern blot de la recombinaison homologue du clone recombinant en 5' et en 3'. La bande correspondant à l'allèle sauvage est à 10 Kb, celles pour les allèles recombinants en 5' et 3' respectivement à 6,6 Kb et 3,4 Kb.

<b>Electroporation</b>	<b>Clones résistants</b>	<b>Clones criblés</b>	<b>Simple recombinant</b>	<b>Double recombinant</b>
1	480	480	23	0
2	384	227	1	0
3	187	187	8	1

Tableau 5 : Résumé des différentes électroporations.

### 3.3.3 Injection des cellules ES *Gasp1* KO dans des blastocystes

Nous avons injecté le clone double recombinant dans 36 blastocystes, de la lignée C57BL/6J, nous permettant d'obtenir 13 chimères, ce qui correspond à une efficacité de transfection de 36%. Ces chimères ont été croisées avec des souris sauvages C57BL/6J afin de vérifier la transmission germinale. Vingt-quatre souris agoutis (13 mâles et 11 femelles) provenant de ces chimères ont été obtenues, leur génotypage est effectué par PCR (Figure 44 et 45). Parmi ces souris, 12 sont porteuses de l'allèle recombinant (6 mâles et 6 femelles).

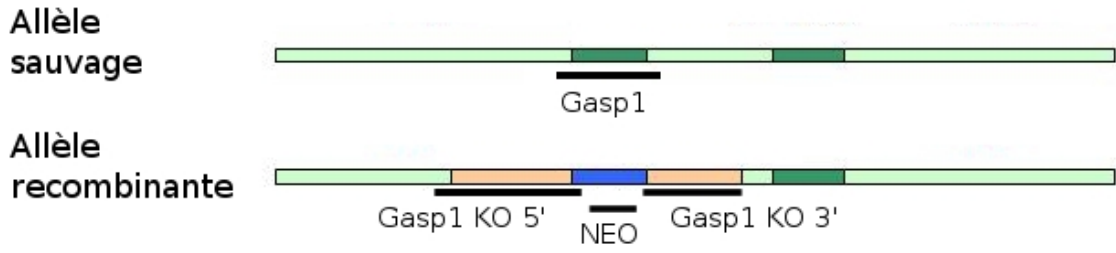


Figure 44 : Schéma des fragments amplifiés lors du génotypage des souris de la lignée *Gasp1* KO.

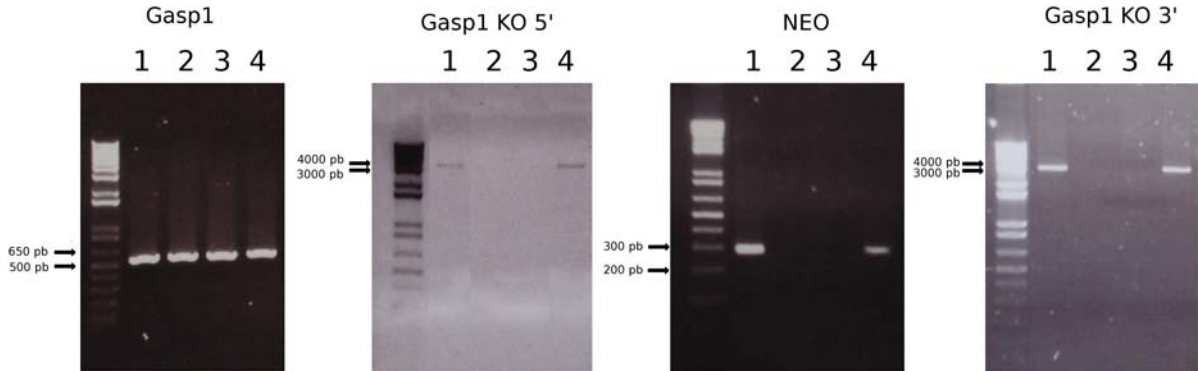


Figure 45 : Génotypage des souris agoutis. Les individus 1 et 4 possèdent l'allèle sauvage et l'allèle recombinant, les individus 2 et 3 ne possèdent que l'allèle sauvage.

## 4 Discussion et perspectives

Les travaux effectués au cours de ma thèse avaient pour objectif l'analyse fonctionnelle d'un nouveau partenaire inhibiteur de la myostatine, *Gasp1*, en particulier, la façon dont il est impliqué dans le développement musculaire. Différentes approches ont été employées, avec l'étude des domaines d'expression de *Gasp1* par hybridation *in situ* et l'analyse de son expression *in vitro* dans la lignée cellulaire C2C12. Une approche *in vivo* est aussi utilisée avec la création d'un modèle murin pour lequel l'inactivation de *Gasp1* est réalisée. Ces approches ont permis d'apporter de nouvelles connaissances concernant ce gène, comme l'identification des domaines d'expression de *Gasp1* au cours de l'embryogenèse et sa cinétique d'expression au cours de la fusion des myoblastes en myotubes. L'approche *in vivo* nous donne la possibilité d'étudier le rôle de ce gène dans un contexte physiologique. Ces connaissances acquises au sein d'un organisme modèle pourraient être transposées chez le bovin permettant ainsi d'expliquer le rôle que *Gasp1* pourrait avoir dans le phénotype d'hypermusculature.

En premier, je discuterai de l'approche *in vitro*, des études et des résultats qui y sont liés, puis de l'approche utilisant l'hybridation *in situ* et finalement de l'approche *in vivo*. Les perspectives seront intégrées au cours de la discussion.

### Etude de l'expression de *Gasp1* au cours de la myogenèse

La caractérisation du modèle cellulaire C2C12 grâce à l'étude de la courbe de fusion et de l'expression des gènes intervenant au cours de la différenciation myogénique a permis de valider l'utilisation de ce modèle cellulaire pour les conditions de cultures utilisées. Les profils d'expression des *MRF* durant la fusion des myoblastes correspondent à ceux décrits dans la littérature (Shimokawa *et al.*, 1998 ; Dedieu *et al.*, 2002). De même que pour les *Pax* dont l'expression au niveau des myoblastes va se retrouver limitée aux cellules satellites (Collins *et al.*, 2009), et *Gdf8* dont l'expression augmente lors de la fusion des myoblastes afin d'inhiber les processus de prolifération et de différenciation (Thomas *et al.*, 2000 ; Langley *et al.*, 2002).

L'expression de *Gasp1* ne varie pas au cours de la différenciation, ce niveau basal d'expression indiquerait une action constante ou une absence d'action de *Gasp1* au cours de la différenciation myogénique, cette action pouvant s'exercer au cours de la phase de prolifération. Des expériences similaires visant à étudier son expression lors de cette phase

ont récemment été entreprises, la quantification de cette expression étant actuellement en cours.

La modification de l'expression normale de *Gasp1* notamment par sa surexpression permet de mieux appréhender sa fonction. Lors de la surexpression de *Gasp1*, la fusion des myoblastes pendant la phase de différenciation n'est pas modifiée. De plus, l'expression des gènes étudiés pour leur implication dans la myogenèse ne semble pas être modifiée. La surexpression de *Gasp1* devrait entraîner sa surexpression au niveau protéique. Cette validation doit être réalisée par western blot. De même, l'augmentation de la sécrétion de Gasp1 sera vérifiée par la même méthode mais en comparant la quantité de Gasp1 présente dans le milieu de culture avec celle contenue dans les cellules. Si Gasp1 est sécrétée alors les quantités retrouvées dans le milieu de culture seront plus importantes que celle dans les cellules. Dans le cas contraire Gasp1 serait séquestrée à l'intérieur des cellules, elle pourrait y être retrouvée sous la forme de corps d'inclusion. Dans le cas d'une absence d'augmentation de Gasp1 sécrétée, un nouveau vecteur permettant cette surexpression devra être réalisé afin de pouvoir observer l'effet, *in vitro*, de cette modification d'expression. Au contraire une surexpression correcte de Gasp1 permettra la réalisation d'études protéiques qui n'ont pas été faites au moment de ces études transcriptomiques. Gasp1 étant capable d'inhiber des TGF $\beta$  on pourrait s'attendre à voir une modification des gènes qu'il régule, comme par exemple la *Myogénine* et *MyoD* qui par l'intermédiaire des Smad sont régulés par la myostatine. Par conséquent on peut s'attendre à ce que les gènes dont la régulation passe par l'intermédiaire d'un TGF $\beta$  potentiellement inhibé par Gasp1 voient leur expression altérée de même que leur niveau protéique.

Les observations faites lors de la surexpression de *Gasp1* indiquent que l'augmentation de son expression au cours d'une transfection transitoire n'a pas d'incidence sur la différenciation des myoblastes. La réalisation d'une transfection stable serait intéressante afin de vérifier si le type de transfection ne serait pas responsable de l'absence de modification phénotypique. En effet les cellules C2C12 sont réputées être difficilement transfectables, la modification du phénotype peut donc ne pas être visible car seulement un petit nombre de cellules surexpriment *Gasp1*. Cependant l'étape de prolifération n'étant pas étudiée les éventuelles modifications provoquées par la surexpression de *Gasp1*, qui peut avoir un rôle plus important lors de cette phase, peuvent ne pas être observées. Rodino-Klapac et coll. (2009) ont montré que, *in vivo*, cette surexpression induite par injection adénovirale au niveau des membres a pour conséquence une augmentation de la masse musculaire qui est spécifique du



muscle squelettique, le muscle cardiaque ne présentant pas d'altération. La surexpression de *Gasp1* est induite par un vecteur où l'ADNc de *Gasp1* est sous le contrôle du promoteur du CMV. L'augmentation de l'expression de *Gasp1* n'est pas forcément corrélée avec un niveau protéique plus important en raison des systèmes de régulations intervenant au cours des différentes étapes conduisant à la production d'une protéine. Une étude permettant de voir si la protéine est surexprimée dans ce système a récemment été entreprise. Actuellement la mise au point des conditions permettant la détection de Gasp1 en western blot est en cours en utilisant un anticorps polyclonal anti-Gasp1. La non sécrétion de Gasp1, notamment par l'utilisation de l'interférence ARN, pourrait provoquer un phénotype d'atrophie des myotubes induit par la myostatine qui n'est alors plus inhibée par Gasp1. La surexpression de Gasp1 pourrait provoquer une inhibition accrue des phénomènes faisant intervenir des protéases ainsi qu'un accroissement de l'inhibition de la myostatine, des mécanismes inverses pourraient être observés dans le cas d'une absence de Gasp1. Cependant, si l'action de Gasp1 n'est pas directe ou s'effectue dans une voie myostatine-indépendante, il est possible que ce phénotype ne puisse pas être observé en culture cellulaire qui constitue un modèle d'étude moins complexe que le modèle murin.

Une étude d'expression similaire pourrait être effectuée pour l'extinction de *Gasp1* en isolant des cellules souches musculaires issues de souris KO pour *Gasp1* et en les cultivant *in vitro*. Une telle culture permettrait d'observer l'impact de l'invalidation de *Gasp1* sur les étapes de prolifération et de différenciation des myoblastes mais aussi sur l'expression des gènes impliqués dans la myogenèse.

De manière plus large, *Gasp1* s'exprimant dans d'autres tissus que le muscle squelettique, son absence pourrait provoquer des modifications, à des niveaux transcriptionnel ou protéique, des gènes autres que ceux intervenant au cours de la myogenèse. Des techniques plus globales telles que des analyses d'expression réalisées grâce à des puces à ADN ou des analyses protéomiques à l'aide de gels 2D couplés à de la spectrométrie de masse pourraient permettre d'identifier ces modifications. L'étude du rôle joué par *Gasp1* dans différents types cellulaires pourrait être effectuée grâce à une orientation de la différenciation de cellules ES KO, cette dernière pouvant être obtenue par l'addition de facteurs de croissance spécifique lors de la culture de ces cellules.

### **Etude des domaines d'expression de *Gasp1* par hybridation *in situ***

Lors de l'embryogenèse, les domaines d'expression de *Gasp1* ont pu être visualisés par hybridation *in situ* à partir de 9,5 jpc bien qu'il puisse être détecté de façon plus précoce grâce à d'autres techniques (Hill *et al.*, 2003). L'avantage de cette technique est de pouvoir observer l'expression spatio-temporelle de gènes. Cependant, dans notre cas, la très faible expression de *Gasp1* a rendu délicate l'étude de ses domaines d'expression par hybridation *in situ*. Dans un premier temps, il a fallu trouver une sonde qui puisse être utilisée en hybridation *in situ* sur embryon *in toto* et qui soit de qualité satisfaisante, c'est à dire qui permet le marquage des différents domaines en ne générant pas de bruit de fond. D'une façon générale, les sondes utilisées en hybridation *in situ* se situent dans la partie 3'UTR du gène permettant ainsi d'obtenir une plus grande spécificité. Cependant, au moment où les sondes ont été sélectionnées, l'annotation du gène était encore incomplète et cette région n'était pas encore identifiée, les sondes ont alors été prises au sein de l'exon 2. Plusieurs sondes ont été testées et malgré cela, celle permettant d'observer le meilleur marquage ne donne pas des résultats satisfaisants.

Les zones, au niveau des membres, où s'exprime *Gasp1*, correspondent à celles où se mettent en place les blastèmes précartilagineux des futurs doigts ainsi que les masses musculaires dorsales et ventrales. La comparaison de ces domaines avec ceux de *Six2* et *Scléroxis* qui interviennent respectivement dans la détermination du lignage chondrogénique et le patron tendon/ligament au niveau des membres (Oliver *et al.*, 1995 ; Brown *et al.*, 1999) concorde avec la position des domaines d'expression de *Gasp1* au niveau des blastèmes précartilagineux des membres. Le recoupement des domaines d'expression de ces gènes indiquerait l'implication de *Gasp1* dans la mise en place des muscles squelettiques au niveau des membres lors du développement embryonnaire.

Au niveau du corps, le marquage observé suggère une expression au niveau du tube neural, des somites et du bourgeon génital. Le seul domaine d'expression qui serait alors commun entre *Gasp1* et *Gdf8* est situé au niveau des somites mais son interprétation est difficile du fait du faible marquage de *Gasp1* en hybridation *in situ*. Cette difficulté pourrait être contournée par la réalisation et l'utilisation d'une souris Knock In (KI) *Gasp1-LacZ* pour laquelle le gène rapporteur *LacZ* serait sous le contrôle du promoteur de *Gasp1* et mimerait donc son expression. Actuellement la réalisation de cette souris est en cours, elle permettra une meilleure observation des domaines d'expression de *Gasp1* mais aussi de réaliser un double marquage *Gasp1-LacZ* et *Gdf8* en hybridation *in situ*.

*Gasp1* pouvant être impliqué dans la mise en place de la musculature au cours de l'embryogenèse, son invalidation pourrait conduire à une modification dans l'établissement des muscles embryonnaires. Cette modification affecterait les domaines d'expression des gènes de la myogenèse, tels que *Pax3* et *Shh* qui s'expriment lors de la formation des somites ou de la *Myogénine* et *MRF4* dont l'expression est en fin de myogenèse. Elle pourrait être visualisée par hybridation *in situ* et permettrait de mieux connaître le rôle de *Gasp1* lors du développement embryonnaire.

### **Etude *in vivo* de la fonction de *Gasp1* grâce à un modèle murin**

La création d'un modèle murin dans lequel *Gasp1* est invalidé, constitue un outil permettant l'étude de son rôle *in vivo* et particulièrement d'appréhender sa fonction dans le développement musculaire. La stratégie utilisée pour la réalisation de ce KO est la recombinaison homologe en cellules ES. Le vecteur de recombinaison possède dans sa structure l'allèle modifié à introduire dans le génome et les gènes permettant la sélection des cellules ES ayant subi un événement de recombinaison.

Le site de linéarisation du vecteur de recombinaison par NotI est très proche de la cassette TK, ce qui à la vue des résultats des deux premières électroporations, nous a fait émettre l'hypothèse que la sélection par le gancyclovir n'était pas assez efficace du fait d'une possible dégradation de la séquence de la TK lors de la linéarisation du plasmide. Ce manque d'efficacité de la sélection a été résolu en utilisant SspI lors de la troisième électroporation. SspI est la seule autre enzyme utilisable pour la linéarisation et dont le site de coupure est éloigné de l'ensemble des séquences servant à la recombinaison.

*Gasp1* possède une séquence riche en GC provoquant des difficultés lors de son amplification qui sont dues à la présence de structures secondaires. De plus, au milieu de son intron se trouvent 16 répétitions du site de coupure pour l'enzyme de restriction PstI. Ces répétitions se situent à la fin de bras d'homologie 3', elles peuvent provoquer une réduction du pourcentage de recombinaison comme pour le cas de l'invalidation de la E-cadhérine (Biet *et al.*, 2003).

Aucun des clones simple recombinant de la première ou de la seconde électroporation ne s'est avéré être double recombinant. Le changement de site de linéarisation du vecteur de recombinaison homologe, pour la troisième électroporation, a permis l'obtention d'un clone double recombinant. Grâce à ce clone, des souris hétérozygotes pour *Gasp1* ont été obtenues, leur croisement a permis très récemment d'établir une lignée murine *Gasp1* KO. Des

croisements entre souris *Gasp1* KO hétérozygotes nous permettront de connaître et d'étudier le phénotype chez les homozygotes. *Gasp1* étant un inhibiteur de la myostatine, le phénotype attendu est une atrophie musculaire, l'inverse du phénotype observé chez les souris *Gdf8* KO. Certaines analyses sur la lignée *Gasp1* KO viennent de débiter et portent sur la courbe de poids, la formule sanguine et des paramètres biochimiques.

Le phénotype attendu pour cette lignée *Gasp1* KO est une atrophie musculaire qui est le phénotype inverse de celui observé lors de la surexpression de *Gasp1*. Cette surexpression grâce un promoteur fort (celui du CMV) après injection adénovirale directement dans le muscle (Rodino-Klapac *et al.*, 2009) ou dans le pronucléus conduisant à l'obtention de lignées transgéniques (Heu, communication personnelle), entraîne une augmentation de la masse musculaire liée à l'inhibition de la myostatine (Hill *et al.*, 2003). Le phénotype attendu pour la lignée *Gasp1* KO serait dû à une augmentation de l'action de la myostatine lors de la myogenèse en raison de l'absence de l'effet inhibiteur de *Gasp1*. L'absence de phénotype pourrait indiquer une compensation de l'inactivation de *Gasp1* par *Gasp2* qui est exprimé au niveau du muscle squelettique fœtal comme *Gasp1* (Trexler *et al.*, 2002). Sa fonction est inconnue mais il pourrait être redondant avec *Gasp1* et donc compenser son inactivation. L'invalidation de *Gasp2* et l'établissement d'une lignée murine *Gasp1/Gasp2* KO permettrait une étude phénotypique de ces gènes tout en s'affranchissant de cette possible redondance.

La caractérisation de cette lignée *Gasp1* KO sera entreprise afin de quantifier les modifications de taille, de type et du nombre des fibres musculaires. Une étude de la force de préhension pourrait aussi être envisagée. *Gasp1* étant aussi exprimé dans d'autres tissus (Hill *et al.*, 2003) une étude anatomique et histologique de ces différents organes pourrait révéler des modifications induites par son absence. D'autres analyses plus spécifiques de certains organes pourraient compléter ces analyses, telles que des études comportementales (cerveau), des tests de fertilité (testicule), des analyses respiratoires (poumon) ainsi que des analyses hématologiques et biochimiques du sang et des urines (rein). Ces analyses apporteraient ainsi une meilleure compréhension du rôle de *Gasp1* dans ces organes.

L'étude de lignées murines porteuses de mutations ponctuelles au sein de *Gasp1* pourrait permettre d'identifier différents allèles où l'action de *Gasp1* serait altérée permettant ainsi une meilleure compréhension de son rôle.

La compréhension du rôle de *Gasp1* au cours du développement musculaire permettra d'approfondir la connaissance de ce gène et de son impact lors de la myogenèse.

Chez l'homme, cela pourrait ouvrir de nouvelles voies dans le traitement des myopathies qui pour l'instant reposent sur l'inhibition de la myostatine ou une augmentation de la follistatine. Dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne avec un anticorps anti-myostatine ou son inactivation en modèle murin, qui permet d'observer un accroissement de la masse musculaire (Bogdanovich *et al.*, 2002 ; Wagner *et al.*, 2002). La myostatine a un effet de régulation négative au niveau de la régénération musculaire de par son action sur l'activation des cellules satellites et la migration des myoblastes et des macrophages au site de blessure, son administration engendrant une cachexie (Zimmer *et al.*, 2002 ; McCroskery *et al.*, 2005 ; Wagner *et al.*, 2005). Son inhibition représente un traitement potentiel des dystrophies musculaires mais aussi des pertes musculaires survenant dans d'autres maladies telles que la cachexie, certains cas de cancer ou de VIH (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998), mais aussi celles dues à l'immobilisation ou à l'âge. Cependant, ces traitements présentent des effets secondaires, ceux reposant sur la follistatine provoquent un arrêt dans le développement des organes reproducteurs menant à la stérilité (Guo *et al.*, 1998). Ceux faisant appel à une inhibition de la myostatine engendrent un affaiblissement des tendons ce qui entraîne une plus grande sensibilité aux blessures lors d'un effort (Mendias *et al.*, 2008)

Suite aux analyses fonctionnelles chez la souris, l'implication de *Gasp1* dans le développement musculaire pourrait être démontrée de façon plus précise grâce à son extinction ou sa surexpression. La recherche de mutations par séquençage chez les races bovines ou d'autres animaux de rente qui possèdent un fort développement musculaire, sans que *Gdf8* ne soit altéré, pourrait permettre d'identifier des mutations de *Gasp1* spécifique à ces races. Ces mutations pourraient provoquer sa surexpression protéique ce qui serait vérifiable par western blot. La recherche de telles mutations conduisant à identifier un allèle dominant-négatif qui provoque la surexpression de *Gasp1* permettrait de déterminer si *Gasp1* est impliqué dans ce phénotype d'hypertrophie musculaire.

La transformation du muscle en viande fait intervenir les mécanismes de l'apoptose et de dégradation des fibres musculaires par des protéases. La tendreté de la viande résultant de cette maturation fait l'objet d'étude notamment au travers des systèmes protéases/anti-protéases mis en jeu. *Gasp1* et *Gasp2* possédant des fonctions d'inhibiteur de protéase, leur

rôle dans cette transformation du muscle en viande et sa tendreté pourrait faire l'objet d'une étude.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont apporté de nouvelles informations, domaines d'expression et cinétique d'expression, sur un nouvel inhibiteur de la myostatine, ainsi que la construction d'une lignée murine *Gasp1* KO qui sera un outil précieux pour continuer l'étude *in vivo* des différentes fonctions de ce gène. Lorsque de plus amples connaissances concernant la fonction de *Gasp1* chez la souris auront été obtenues, des études afin de les transférer chez le bovin pourront alors être envisagées.

## Bibliographie

- Amthor H., Christ B., Patel K. (1999). A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth – a balance between proliferation and differentiation. Development, **126**, 1041-1053.
- Amthor H., Christ B., Weil M., Patel K. (1998). The importance of timing differentiation during limb muscle development. Curr. Biol., **8**, 642-652.
- Amthor H., Nicholas G., McKinnell I., Kemp C.F., Sharma M., Kambadur R., Patel K. (2004). Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. Dev. Biol., **270**(2004), 19-30.
- Anakwe K., Robson L., Hadley J., Buxton P., Church V., Allen S., Hartmann C., Harfe B., Nohno T., Brown A.M.C., Evans D.J.R., Francis-West F. (2003). Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. Development, **130**, 3503-3514.
- Aoki M.S., Soares A.G., Miyabara E.H., Baptista I.L., Moriscot A.S. (2009). Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth. Muscle Nerve, ,
- Arthur P.F., Makarechian M., Price M.A., Berg R.T. (1989). Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: I. Reproduction and growth traits. J. Anim. Sci., **67**, 902-910.
- Arthur P.F., Makarechian M., Price M.A., Berg R.T. (1989). Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: II. Carcass traits of young bulls. J. Anim. Sci., **67**(911), 919
- Arthur P.F., Makarechian M., Salmon R.K., Price M.A. (1990). Plasma growth hormone and insulin concentrations in double-muscled and normal bull calves. J. Anim. Sci., **68**, 1609-1615.
- Bailey P., Holowacz T., Lassar A.B. (2001). The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult. Curr. Opin. Cell Biol., **13**, 670-689.
- Banyai L., Patthy L. (1999). The NTR module: Domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. Protein Sci., **8**, 1636-1642.
- Barresi M.J.F., Stickney H.L., Devoto S.H. (2000). The zebrafish slow-muscle-omitted gene product is required for Hedgehog signal transduction and the development of slow muscle identity. Development, **127**, 2189-2199.
- Beauchamp J.R., Heslop L., Yu D.S.W., Tajbakhsh S., Kelly R.G., Wernig A., Buckingham M.E., Partridge T.A., Zammit P.S. (2000). Expression of CD34 and Myf5 Defines the Majority of Quiescent Adult Skeletal Muscle Satellite Cells. J. Cell Biol., **151**(6), 1221-1233.
- Biet E., Larue L., Dutreix M. (2003). Homologous recombination and gene targeting. C. R. Biol., **326**, 51-64.
- Bigard X., Sanchez H., Zoll J., Mateo P., Rousseau V., Veksler V., Ventura-Clapier R. (2000). Calcineurin Co-regulates Contractile and Metabolic Components of Slow Muscle Phenotype. J. Biol. Chem., **275**(26), 19653-19660.

- Blagden C.S., Currie P.D., Ingham P.W., Hughes S.M. (1997). Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. Genes Dev., **11**, 2163-2175.
- Blagden C.S., Hughes S.M. (1999). Extrinsic influences on limb muscle organisation. Cell Tissue Res., **296**(141), 150
- Bober E., Brand-Saberi B., Ebensperger C., Wilting J., Balling R., Paterson B.M., Arnold H.-H., Christ B. (1994). Initial steps of myogenesis in somites are independent of influence from axial structures. Development, **120**, 3073-3082.
- Bober E., Franz T., Arnold H.-H., Gruss P., Tremblay P. (1994). Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. Development, **120**, 603-612.
- Bogdanovich S., Krag T.O.B., Barton E.R., Morris L.D., Whittemore L.-A., Ahima R.S., Khurana T.S. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. Nature, **420**, 418-421.
- Boone Miller J. (1990). Myogenic Programs of Mouse Muscle Cell Lines: Expression of Myosin Heavy Chain Isoforms, MyoD1, and Myogenin. J. Cell Biol., **111**, 1149-1159.
- Borello U., Coletta M., Tajbakhsh S., Leyns L., De Robertis E.M., Buckingham M., Cossu G. (1999). Transplacental delivery of the Wnt antagonist Frzb1 inhibits development of caudal paraxial mesoderm and skeletal myogenesis in mouse embryos. Development, **126**, 4247-4255.
- Borycki A.-G., Brunk B., Tajbakhsh S., Buckingham M., Chiang C., Emerson, Jr C.P. (1999). Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. Development, **126**, 4053-4063.
- Brand-Saberi B., Christ B. (1999). Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. Cell Tissue Res., **296**, 199-212.
- Brand-Saberi B., Gamel A.J., Krenn V., Müller T.S., Wilting J., Christ B. (1996). N-Cadherin Is Involved in Myoblast Migration and Muscle Differentiation in the Avian Limb Bud. Dev. Biol., **178**, 160-173.
- Brand-saberi B., Wilting J., Ebensperger C., Christ B. (1996). The formation of somite compartments in the avian embryo. Int. J. Dev. Biol., **40**, 411-420.
- Braun T., Rudnicki M.A., Arnold H.-H., Jaenisch R. (1992). Targeted Inactivation of the Muscle Regulatory Gene Myf-5 Results in Abnormal Rib Development and Perinatal Death. Cell, **71**, 369-382.
- Bren-Mattison Y., Olwin B.B. (2002). Sonic Hedgehog Inhibits the Terminal Differentiation of Limb Myoblasts Committed to the Slow Muscle Lineage. Dev. Biol., **242**, 130-148.
- Brockman R.P. (1978). Roles of Glucagon and Insulin in the Regulation of Metabolism in Ruminants. Can. Vet. J., **19**, 55-62.
- Brown D., Wagner D., Li X.-Q., Richardson J.A., Olson E.N (1999). Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. Development, **126**, 4317-4329.
- Bryson-Richardson R.J., Currie P.D. (2008). The genetics of vertebrate myogenesis. Nat. Rev. Genet., **9**, 632-646.



- Buckingham M., Bajard L., Chang T., Daubas P., Hadchouel J., Meilhac S., Montarras D., Rocancourt D., Relaix F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.*, **202**, 59-68.
- Buffinger N., Stockdale F.E. (1994). Myogenic specification in somites: induction by axial structures. *Development*, **120**, 1443-1452.
- Burgering M.J.M., Orbons L.P.M., van der Doelen A., Mulders J., Theunissen H.J.M., Grootenhuis P.D.J., Bode W., Huber R., Stubbs M.T. (1997). The Second Kunitz Domain of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor: Cloning, Structure Determination and Interaction with Factor Xa. *J. mol. Biol.*, **269**, 395-407.
- Cann G.M., Lee J.W., Stockdale F.E. (1999). Sonic hedgehog enhances somite cell viability and formation of primary slow muscle fibers in avian segmented mesoderm. *Anat. Embryol.*, **200**, 239-252.
- Charlier C., Coppeters W., Farnir F., Grobet L., Leroy P.L., Michaux C., Mni M., Schwers A., Vanmanshoven P., Hanset R., Georges M. (1995). The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm. Genome*, **6**, 788-792.
- Chiang C., Litington Y., Lee E., Young K.E., Corden J.L., Westphal H., Beachy P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic Hedgehog gene function. *Nature*, **383**, 407-413.
- Chin E.R., Olson E.N., Richardson J.A., Yang Q., Humphries C., Shelton J.M., Wu H., Zhu W., Bassel-Duby R., Williams R.S. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.*, **12**, 2499-2509.
- Clop A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.-M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.*, **38**(7), 813-818.
- Collins C.A., Gnocchi V.F., White R.B., Boldrin L., Perez-Ruiz A., Relaix F., Morgan J.E., Zammit P.S. (2009). Integrated Functions of Pax3 and Pax7 in the Regulation of Proliferation, Cell Size and Myogenic Differentiation. *PLoS ONE*, **4**(2),
- Conboy I.M., Rando T.A. (2002). The Regulation of Notch Signaling Controls Satellite Cell Activation and Cell Fate Determination in Postnatal Myogenesis. *Dev. Cell*, **3**, 397-409.
- Cornelison D.D.W., Olwin B.B., Rudnicki M.A., Wold B.J. (2000). MyoD<sup>-/-</sup> Satellite Cells in Single-Fiber Culture Are Differentiation Defective and MRF4 Deficient. *Dev. Biol.*, **224**, 122-137.
- Currie P.D., Ingham P.W. (1996). Induction of a specific muscle cell type by a hedgehog-like protein in zebrafish. *Nature*, **382**, 452-455.
- Daston G., Lamar E., Olivier M., Goulding M. (1996). Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse. *Development*, **122**, 1017-1027.
- De Angelis L., Berghella L., Coletta M., Lattanzi L., Zanchi M., Cusella-De Angelis M.G., Ponzetto C., Cossu G. (1999). Skeletal Myogenic Progenitors Originating from Embryonic Dorsal Aorta Coexpress Endothelial and Myogenic Markers and Contribute to Postnatal Muscle Growth and Regeneration. *J. Cell Biol.*, **147**(4), 869-877.

- Dedieu S., Mazères G., Cottin P., Brustis J.-J. (2002). Involvement of myogenic regulator factors during fusion in cell line C2C12. Int. J. Dev. Biol., 46,
- Delfini M.-C., Duprez D. (2000). Paraxis is expressed in myoblasts during their migration and proliferation in the chick limb bud. Mech. Dev., 96, 247-251.
- Delfini M.-C., Duprez D. (2004). Ectopic Myf5 or MyoD prevents the neuronal differentiation program in addition to inducing skeletal muscle differentiation, in the chick neural tube. Development, 131, 713-723.
- Delfini M.-C., Hirsinger E., Pourquié O., Duprez D. (2000). Delta 1-activated Notch inhibits muscle differentiation without affecting Myf5 and Pax3 expression in chick limb myogenesis. Development, 127, 5213-5224.
- Denetclaw Jr. W.F., Christ B., Ordahl C.P. (1997). Location and growth of epaxial myotome precursor cells. Development, 124, 1601-1610.
- Dietrich S., Schubert F.R., Lumsden A. (1997). Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm. Development, 124, 3895-3908.
- DiMario J.X., Fernyak S.E., Stockdale F.E. (1993). Myoblasts transferred to the limbs of embryos are committed to specific fibre fates. Nature, 362, 165-167.
- DiMario J.X., Stockdale F.E. (1997). Both Myoblast Lineage and Innervation Determine Fiber Type and Are Required for Expression of the Slow Myosin Heavy Chain 2 Gene. Dev. Biol., 188, 167-180.
- DiMario J.X., Stockdale F.E. (1995). Differences in the developmental fate of cultured and noncultured myoblasts when transplanted into embryonic limbs. Exp. Cell Res., 216, 431-442.
- Du S.J., Devoto S.H., Westerfield M., Moon R.T. (1997). Positive and Negative Regulation of Muscle Cell Identity by Members of the hedgehog and TGF-beta Gene Families. J. Cell Biol., 139(1), 145-156.
- Dunn S.E., Burns J.L., Michel R.L. (1999). Calcineurin Is Required for Skeletal Muscle Hypertrophy. J. Biol. Chem., 274(31), 21908-21912.
- Dunner S., Miranda M.E., Amigues Y., Canon J., Georges M., Hanset R., Williams J., Ménessier F. (2003). Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. Gent. Sci. Evol., 35, 103-118.
- Duprez D., Fournier-Thibault C., Le Douarin N. (1998). Sonic Hedgehog induces proliferation of committed skeletal muscle cells in the chick limb. Development, 125, 495-505.
- Duxson M.J., Sheard P.W. (1995). Formation of New Myotubes Occurs Exclusively at the Multiple Innervation Zones of an Embryonic Large Muscle. Dev. Dyn., 204, 391-405.
- Duxson M.J., Usson Y., Harris J. (1989). The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. Development, 107, 743-750.
- Edom-Vovard F., Bonnin M.-A., Duprez D. (2001). Misexpression of Fgf-4 in the Chick Limb Inhibits Myogenesis by Down-Regulating Fkfr Expression. Dev. Biol., 233, 56-71.
- Evans D., Baillie H., Caswell A., Wigmore P. (1994). During fetal muscle development, clones of cells contribute to both primary and secondary fibers. Dev. Biol., 162, 348-353.

- Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M., Paolucci E., Stornaiuolo A., Cossu G., Mavilio F. (1998). Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. Science, 279, 1528-1530.
- Francis-West P.H., Antoni L., Anakwe K. (2003). Regulation of myogenic differentiation in the developing limb bud. J. Anat., 202, 69-81.
- Gamer L.W., Wolfman N.M., Celeste A.J., Hattersley G., Hewick R., Rosen V. (1999). A Novel BMP Expressed in Developing Mouse Limb, Spinal Cord, and Tail Bud Is a Potent Mesoderm Inducer in *Xenopus* Embryos. Dev. Biol., 208, 222-232.
- Giordani J., Bajard L., Demignon J., Daubas P., Buckingham M., Maire P. (2007). Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 104(27), 11310-11315.
- Gonzalez-Cadavid N.F., Taylor W.E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen R., Lalani R., Asa S., Mamita M., Nair G., Arver S., Bashin S. (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 14938-14943.
- Grifone R., Demignon J., Giordani J., Niro C., Souil E., Bertin F., Laclef C., Xu P.-X., Maire P. (2007). Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. Dev. Biol., 302, 602-616.
- Grifone R., Demignon J., Houbron C., Souil E., Niro C., Seller M.J., Hamard G., Maire P. (2005). Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. Development, 132, 2235-2249.
- Grobet L., Martin L.J.R., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménéssier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Goerges M. (1997). A deletion in the bovine myostation gene causes the double-musled phenotype in cattle. Nat. Genet., 17, 71-74.
- Grobet L., Pirottin D., Farnir F., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Christians E., Desmecht D., Coignoul F., Kahn R., Georges M. (2003). Modulating Skeletal Muscle Mass by Postnatal, Muscle-Specific Inactivation of the Myostatin Gene. Genesis, 35, 227-238.
- Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Ménéssier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. Mamm. Genome, 9, 210-213.
- Gross M.K., Moran-Rivard L., Velasquez T., Nakatsu M.N., Jagla K., Goulding M. (2000). Lbx1 is required for muscle precursor migration along a lateral pathway into the limb. Development, 127, 413-424.
- Guo Q., Rajendra Kumar T., Woodruff T., Hadsell L.A., DeMayo F.J., Matzuk M.M. (1998). Overexpression of Mouse Follistatin Causes Reproductive Defects in Transgenic Mice. Mol. Endocrinol., 12, 96-106.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C.D., Buzney E.A., Khan M.K., Flint A.F., Kunkel L.M., Mulligan R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature, 401, 390-394.
- Hanset R., Michaux C. (1985). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed I. Experimental data. Genet. Sel. Evol., 17, 359-368.

- Hanset R., Michaux C. (1985). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed II. Population data. Genet. Sel. Evol., 17, 369-386.
- Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmondson D.G., Venuti J.M., Olson E.N., Klein W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. Nature, 364, 501-506.
- Heanue T.A., Reshef R., Davis R.J., Mardon G., Oliver G., Tomarev S., Lassar A.B., Tabin C.J. (1999). Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. Genes Dev., 13, 3231-3243.
- Helland R., Otlewski J., Sundheim O., Dadlez M., Smalas A.O. (1999). The Crystal Structures of the Complexes Between Bovine beta-Trypsin and Ten P1 Variants of BPTI. J. Mol. Biol., 287, 923-942.
- Hill J.J., Qiu Y., Hewick R.M., Wolfman N.M. (2003). Regulation of Myostatin in Vivo by Growth and Differentiation Factor-Associated Serum Protein-1: A Novel Protein with Protease Inhibitor and Follistatin Domains. Mol. Endocrinol., 17(6), 1144-1154.
- Hill J.J., Davies M.V., Pearson A.A., Wang J.H., Hewick R.M., Wolfman N.M., Qiu Y. (2002). The Myostatin Propeptide and the Follistatin-related Gene Are Inhibitory Binding Proteins of Myostatin in Normal Serum. J. Biol. Chem., 277(43), 40735-40741.
- Hirsinger E., Malapert P., Dubrulle J., Delfini M.-C., Duprez, Henricque D., Ish-Horowicz D., Pourqu   O. (2001). Notch signalling acts in postmitotic avian myogenic cells to control MyoD activation. Development, 128, 107-116.
- Hocquette J.-F., Bas P., Bauchart D., Vermorel M., Geay Y. (1999). Fat partitioning and biochemical characteristics of fatty tissues in relation to plasma metabolites and hormones in normal and double-muscled young growing bulls. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol., 122, 127-138.
- Hohenester E., Maurer P., Timpl R. (1997). Crystal structure of a pair of follistatin-like and EF-hand calcium-binding domains in BM-40. EMBO J., 16(13), 3778-3786.
- Holmes J.H.G., Ashmore C.R., Robinson D.W. (1973). Effects of stress on cattle with hereditary muscular hypertrophy. J. Anim. Sci., 36, 684-694.
- Huang R., Christ B. (2000). Origin of the epaxial and hypaxial myotome in avian embryos. Anat. Embryol., 202(369), 374
- Hughes S.M., Blau H.M. (1992). Muscle Fiber Pattern Is Independent of Cell Lineage in Postnatal Rodent Development. Cell, 68, 659-671.
- Hughes S.M., Chi M.M.-Y., Lowry O.H., Gundersen K. (1999). Myogenin Induces a Shift of Enzyme Activity from Glycolytic to Oxidative Metabolism in Muscles of Transgenic Mice. J. Cell Biol., 145(3), 633-642.
- Hughes S.M., Koishi K., Rudnicki M., Maggs A.M. (1997). MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. Mech. Dev., 61, 151-163.
- Hughes S.M., Salinas P.C. (1999). Control of muscle fibre and motoneuron diversification. Curr. Opin. Neurobiol., 9, 54-64.

- Ikeya M., Takada S. (1998). Wnt signaling from the dorsal neural tube is required for the formation of the medial dermomyotome. Development, *125*, 4969-4976.
- Istasse L., Van Eenaeme C., Evrard P., Gabriel A., Baldwin P., Maghuin-Rogister G., Bienfait J.M. (1990). Animal performance, plasma hormones and metabolites in Holstein and Belgian Blue growing-fattening bulls. J. Anim. Sci., *68*, 2666-2673.
- Itoh N., Mima T., Mikawa T. (1996). Loss of fibroblast growth factor receptors is necessary for terminal differentiation of embryonic limb muscle. Development, *122*, 291-300.
- Jaffredo T., Horwitz A.F., Buck C.A., Rong P.M., Dieterlen-lievre F. (1988). Myoblast migration specifically inhibited in the chick embryo by grafted CSAT hybridoma cells secreting an anti-integrin antibody. Development, *103*, 431-446.
- Ji S., Losinski R.L., Cornelius S.G., Frank G.R., Willis G.M., Gerrard D.E., Depreux F.F.S., Spurlock M.E. (1998). Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. Am. J. Physiol., *275*, 1265-1273.
- Jouliat D., Bernardi H., Garandel V., Rabenoelina F., Vernus B., Cabello G. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. Exp. Cell Res., *286*, 263-275.
- Jouliat-ekaza D., Cabello G. (2006). Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. Experimental Cell Research, *312*, 2401-2414.
- Kablar B., Krastel K., Ying C., Tapscott S.J., Goldhamer D.J., Rudnicki M.A. (1999). Myogenic Determination Occurs Independently in Somites and Limb Buds. Dev. Biol., *206*, 219-231.
- Kahane N., Cinnamon Y., Kalcheim C. (1998). The origin and fate of pioneer myotomal cells in the avian embryo. Mech. Dev., *74*, 59-73.
- Kambadur R., Sharma M., Smith T.P.L., Bass J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF-8) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. Genome Res., *7*, 910-915.
- Kardon G., Kloetzli Campbell J., Tabin C.J. (2002). Local Extrinsic Signals Determine Muscle and Endothelial Cell Fate and Patterning in the Vertebrate Limb. Dev. Cell, *3*, 533-545.
- Knapp J.R., Davie J.K., Myer A., Meadows E., Olson E.N., Klein W.H. (2006). Loss of myogenin in postnatal life leads to normal skeletal muscle but reduced body size. Development, *133*, 601-610.
- Kondás K., Szláma G., Trexler M., Patthy L. (2008). Both WFIKKN1 and WFIKKN2 Have High Affinity for Growth and Differentiation Factor 8 and 11. J. Biol. Chem., *238*(35), 23677-23684.
- Krawczak M., Reiss J., Cooper D.N. (1992). The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. Hum. Genet., *90*, 41-54.
- Krüger M., Mennerich D., Fees S., Schäfer R., Mundlos S., Braun T. (2001). Sonic hedgehog is a survival factor for hypaxial muscles during mouse development. Development, *128*, 743-752.
- Kuang S., Kuroda K., Le Grand F., Rudnicki M.A. (2007). Asymmetric Self-Renewal and Commitment of Satellite Stem Cells in Muscle. Cell, *129*, 999-1010.

- Kühl M., Sheldahl L.C., Malbon C.C., Moon R.T. (2000). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II Is Stimulated by Wnt and Frizzled Homologs and Promotes Ventral Cell Fates in *Xenopus*. J. Biol. Chem., *275*(17), 12701-12711.
- Ladher R.K., Church V.L., Allen S., Robson L., Abdelfattah A., Brown N.A., Hattersley G., Rosen V., Luyten F.P., Dale L., Francis-West P.H. (2000). Cloning and Expression of the Wnt Antagonists Sfrp-2 and Frzb during Chick Development. Dev. Biol., *218*, 183-198.
- Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., Kambadur R. (2002). Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression. J. Biol. Chem., *277*(51), 49831-49840.
- Lee S.-J., McPherron A. (1999). Myostatin and the control of skeletal muscle mass. Curr. Opin. Genet. Dev., *9*, 604-607.
- Lee S.-J., McPherron A. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *98*(16), 9306-9311.
- Lewis K.E., Currie P.D., Roy S., Schauerte H., Haffter P., Ingham P.W. (1999). Control of Muscle Cell-Type Specification in the Zebrafish Embryo by Hedgehog Signalling. Development, *216*, 469-480.
- Liepinsh E., Nagy A., Trexler M., Patthy L., Otting G. (2006). Second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN1 protein. J. Biomol. NMR, *35*, 73-78.
- Lindon C., Montarras D., Pinset C. (1998). Cell Cycle-regulated Expression of the Muscle Determination Factor Myf5 in Proliferating Myoblasts. J. Cell Biol., *140*(1), 111-118.
- Ma K., Mallidis C., Artaza J., Taylor W., Gonzalez-Cadavid N., Bhasin S. (2001). Characterization of 59-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. Am. J. Endocrinol. Metab., *281*, E1128-E1136.
- Ma K., Mallidis C., Bhasin S., Mahabadi V., Artaza J., Gonzalez-Cadavid N., Arias J., Salehian B. (2003). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. Am. J. Endocrinol. Metab., *285*, E363-E371.
- Mankoo B.S., Collins N.S., Ashby P., Grigorieva E., Pevny L.H., Candia A., Wright C.V.E., Rigby P.W.J., Pachnis V. (1999). Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. Nature, *399*, 69-73.
- Marchitelli C., Savarese M.C., Crisà A., Nardone A., Marsan P.A., Valentini A. (2003). Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. Mamm. Genome, *14*(6), 392-395.
- Marics I., Padilla F., Guillemot J.-F., Scaal M., Marcelle C. (2002). FGFR4 signaling is a necessary step in limb muscle differentiation. Development, *129*, 4559-4569.
- Maroto M., Reshef R., Münsterberg A.E., Koester S., Goulding M., Lassar A.B (1997). Ectopic Pax-3 Activates MyoD and Myf-5 Expression in Embryonic Mesoderm and Neural Tissue. Cell, *89*, 139-148.
- McCroskery S., Thomas M., Platt L., Hennebry A., Nishimura T., McLeay L., Sharma M., Kambadur R. (2005). Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. J. Cell. Sci., *118*, 3531-3541.
- McPherron A., Lee S.-J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., *94*, 12457-12461.

- McPherron A.C., Lawer A.M., Lee S-J (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta super family member. Nature, 387(1 mai), 83-90.
- Mendias C.L., Bakhurin K.I., Faulkner J.A. (2008). Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105, 388-393.
- Miller J.B., Stockdale F.E. (1986). Developmental Regulation of the Multiple Myogenic Cell Lineages of the Avian Embryo. J. Cell Biol., 103(6), 2197-2208.
- Miller J.B., Stockdale F.E. (1986). Developmental origins of skeletal muscle fibers: Clonal analysis of myogenic cell lineages based on expression of fast and slow myosin heavy chains. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83, 3860-3864.
- Mott J.D., Thomas C.L., Rosenbach M.T., Takahara K., Greenspan D.S., Banda M.J. (2000). Post-translational Proteolytic Processing of Procollagen C-terminal Proteinase Enhancer Releases a Metalloproteinase Inhibitor. J. Biol. Chem., 275(2), 1384-1390.
- Münsterberg A.E., Kitajewski J., Bumcrot D.A., McMahon A.P., Lassar A.B. (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. Genes Dev., 9, 2911-2922.
- Münsterberg A.E., Lassar A.B. (1995). Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. Development, 121, 651-660.
- Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Esumi E., Li S., Nonaka I., Nabeshima Y-I. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. Nature, 364, 532-534.
- Nagy A., Trexler M., Patthy L. (2003). Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein. Eur. J. Biochem., 270, 2101-2107.
- Nakamura T., Takio K., Eto Y., Shibai H., Titani K., Sugino H. (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. Science, 247, 836-838.
- Naya F.J., Mercer B., Shelton J., Richardson J.A., Sanders Williams R., Olson E.N. (2000). Stimulation of Slow Skeletal Muscle Fiber Gene Expression by Calcineurin in Vivo. J. Biol. Chem., 275(7), 4545-4548.
- Nicholas G., Thomas M., Langley B., Somers W., Patel K., Kemp C.F., Sharma M., Kambadur R. (2002). Titin-Cap Associates With, and Regulates Secretion of, Myostatin. J. Cell. Physiol., 193, 120-131.
- Nikovits, Jr W., Cann G.M., Huang R., Christ B., Stockdale F.E. (2001). Patterning of fast and slow fibers within embryonic muscles is established independently of signals from the surrounding mesenchyme. Development, 128, 2537-2544.
- Oliver G., Wehr R., Jenkins N.A., Copeland N.G., Cheyette B.N.R., Hartenstein V., Zipursky S.L., Gruss P. (1995). Homeobox genes and connective tissue patterning. Development, 121, 693-705.
- Ordahl C.P., Berdougo E., Venters S.J., Denetclaw, Jr W.F. (2001). The dermomyotome dorsomedial lip drives growth and morphogenesis of both the primary myotome and dermomyotome epithelium. Development, 128, 1731-1744.
- Ordahl C.P., Le Douarin N.M. (1992). Two myogenic lineages within the developing somite. Development, 114, 339-353.

- Ostbye T.-K., Galloway T.F., Nielsen C., Gabestad I., Bardal T., Andersen O. (2001). The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. Eur. J. Biochem., *268*, 5249-5257.
- Ott M.-O., Bober E., Lyons G., Arnold H., Buckingham M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. Development, *111*(1097), 1107
- Oustanina S., Hause G., Braun T. (2004). Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. EMBO J., *23*(16), 3430-3439.
- Parr B.A., McMahon A.P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. Nature, *374*, 350-353.
- Philip B., Lu Z., Gao Y. (2005). Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. Cell. Signal., *17*, 365-375.
- Pourquié O., Fan C.-M., Coltey M., Hirsinger E., Watanabe Y., Bréant C., Francis-West P., Brickell P., Tessier-Lavigne M., Le Douarin N.M. (1996). Lateral and Axial Signals Involved in Avian Somite Patterning: A Role for BMP4. Cell, *84*, 461-471.
- Pownall M.E., Emerson Jr C.P. (1992). Sequential Activation of Three Myogenic Regulatory Genes during Somite Morphogenesis in Quail Embryos. Dev. Biol., *151*, 67-79.
- Pownall M.E., Strunk K.E., Emerson, Jr C.P. (1996). Notochord signals control the transcriptional cascade of myogenic bHLH genes in somites of quail embryos. Development, *122*, 1475-1488.
- Péault B., Rudnicki M., Torrente Y., Cossu G., Tremblay J.P., Partridge T., Gussoni E., Kunkel L.M., Huard J. (2007). Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. Mol. Ther., *15*(5), 867-877.
- Rawls A., Morris J.H., Rudnicki M., Braun T., Arnold H.-H., Klein W.H., Olson E.N. (1995). Myogenin's Functions Do Not Overlap with Those of MyoD or Myf-5 during Mouse Embryogenesis. Dev. Biol., *172*, 37-50.
- Rebbapragada A., Benchabane H., Wrana J. L., Celeste A. J., Attisano L. (2003). Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor Beta-Like Signaling Pathway To Block Adipogenesis. Mol. Cell. Biol., *23*, 7230-7242.
- Relaix F., Buckingham M. (1999). From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network. Genes Dev., *13*, 3171-3178.
- Relaix F., Montarras D., Zaffran S., Gayraud-Morel B., Rocancourt D., Tajbakhsh S., Mansouri A., Cumanò A., Buckingham M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. J. Cell Biol., *172*(1), 91-102.
- Rescan P.-Y., Jutel I., Rallièrè C. (2001). Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol., *204*, 3523-3529.
- Reshef R., Maroto M., Lassar A.B. (1998). Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression. Genes Dev., *12*, 290-303.
- Riddle R.D., Ensini M., Nelson C., Tsuchida T., Jessell T.M., Tabin C. (1995). Induction of the LIM Homeobox Gene *Lmx7* by WNT7a Establishes Dorsoventral Pattern in the Vertebrate Limb. Cell, *83*, 631-640.



- Rios R., Carneiro I., Arce V.M., Devesa J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. Am. J. Physiol., Cell. Physiol., 282, C993-C999.
- Rios R., Carneiro I., Arce V.M., Devesa J. (2001). Myostatin Regulates Cell Survival during C2C12 Myogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 280, 561-566.
- Roberts S.B., Goetz F.W. (2001). Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. FEBS Lett., 491, 212-216.
- Robson L.G., Hughes S.M. (1999). Local signals in the chick limb bud can override myoblast lineage commitment: induction of slow myosin heavy chain in fast myoblasts. Mech. Dev., 85, 59-71.
- Robson L.G., Hughes S.M. (1996). The distal limb environment regulates MyoD accumulation and muscle differentiation in mouse-chick chimeric limbs. Development, 122, 3899-3910.
- Robson L.G., Kara T., Crawley A., Tickle C. (1994). Tissue and cellular patterning of the musculature in chick wings. Development, 120, 1265-1276.
- Rodino-Kaplan L.R., Haidet A.M., Kota J., Handy C., Kaspar B.K., Mendell J.R. (2009). Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. Muscle Nerve, 39, 283-296.
- Roy S., Wolff C., Ingham P.W. (2001). The u-boot mutation identifies a Hedgehog-regulated myogenic switch for fiber-type diversification in the zebrafish embryo. Genes Dev., 15, 1563-1576.
- Rudnicki M.A., Braun T., Hinuma S., Jaenisch R. (1992). Inactivation of MyoD in Mice Leads to Up-Regulation of the Myogenic HLH Gene Myf-5 and Results in Apparently Normal Muscle Development. Cell, 71, 383-390.
- Rudnicki M.A., Schnegelsberg P.N.J., Stead R.H., Braun T., Arnold H.-H., Jaenisch R. (1993). MyoD or Myf-5 Is Required for the Formation of Skeletal Muscle. Cell, 75, 1351-1359.
- Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Seale P., Asakura A., Rudnicki M.A. (1999). Reduced Differentiation Potential of Primary MyoD<sup>-/-</sup> Myogenic Cells Derived from Adult Skeletal Muscle. J. Cell Biol., 144(4), 631-643.
- Salerno M.S., Thomas M., Forbes D., Watson T., Kambadur R., Sharma M. (2004). Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. Am. J. Physiol. Cell Physiol., 287, C1031-C1040.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74(12), 5463-5467.
- Sassoon D.A. (1993). Myogenic regulatory factors: dissecting their role and regulation during vertebrate embryogenesis. Dev. Biol., 156, 11-23.
- Scaal M., Bonafede A., Dathe V., Sachs M., Cann G., Christ B., Brand-Saberi B. (1999). SF/HGF is a mediator between limb patterning and muscle development. Development, 126, 4885-4893.
- Schmidt C., Christ B., Maden M., Brand-Saberi B., Patel K. (2001). Regulation of EphA4 Expression in Paraxial and Lateral Plate Mesoderm by Ectoderm-Derived Signals. Dev. Dyn., 220, 377-386.

- Schmidt C., Christ B., Patel K., Brand-Saberi B. (1998). Experimental Induction of BMP-4 Expression Leads to Apoptosis in the Paraxial and Lateral Plate Mesoderm. Dev. Biol., 202, 253-263.
- Schneyer A., Tortoriello D., Sidis Y., Keutmann H., Matsuzaki T., Holmes W. (2001). Follistatin-related protein (FSRP): a new member of the follistatin gene family. Mol. Cell. Endocrinol., 180, 33-38.
- Schuelke M., Wagner K.R., Stolz L.E., Hübner C., Riebel T., Kömen W., Braun T., Tobin J.F., Lee S.-J. (2004). Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. N. Engl. J. Med., 350, 2682-2688.
- Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P., Rudnicki M.A. (2000). Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. Cell, 102, 777-786.
- Seed J., Hauschka D. (1984). Temporal Separation of the Migration of Distinct Myogenic Precursor Populations into the Developing Chick Wing Bud. Development, 106, 389-393.
- Serrano A.L., Murgia M., Pallafacchina G., Calabria E., Coniglio P., Lømo T., Schiaffino S. (2001). Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98(23), 13108-13113.
- Shimokawa T., Kato M., Ezaki O., Hashimoto S. (1998). Transcriptional Regulation of Muscle-Specific Genes during Myoblast Differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 246, 287-292.
- Shinin V., Gayraud-Morel B., Gomès D., Tajbakhsh S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. Nat. Cell Biol., 8(7), 677-687.
- Slusarski D.C., Corces V.G., Moon R.T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. Nature, 390, 410-413.
- Slusarski D.C., Yang-Snyder J., Busa W.B., Moon R.T. (1997). Modulation of Embryonic Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling by Wnt-5A. Dev. Biol., 182, 114-120.
- Spiller M.P., Kambadur R., Jeanplong F, Thomas M., Martyn J.K., Bass J.J., Sharma M. (2002). The Myostatin Gene Is a Downstream Target Gene of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor MyoD. Mol. Cell. Biol., 22, 7066-7082.
- Spitz F., Demignon J., Porteu A., Kahn A., Concordet J.-P., Daegelen D., Maire P. (1998). Expression of myogenin during embryogenesis is controlled by Six3 homeoproteins through a conserved MEF3 binding site. Dev. Biol., 95, 14220-14225.
- Stern H.M., Brown A.M.C., Hauschka S.D. (1995). Myogenesis in paraxial mesoderm: preferential induction by dorsal neural tube and by cells expressing Wnt-1. Development, 121, 3675-3696.
- Stockdale F.E. (1990). Myoblast Diversity and the Formation of the Early Limb Musculature. Ann. N.Y. Acad. Sci., 599, 111-118.
- Swartz M.E., Eberhart J., Pasquale E.B., Krull C.E. (2001). EphA4/ephrin-A5 interactions in muscle precursor cell migration in the avian forelimb. Development, 128, 4669-4680.
- Szabó G., Dallmann G., Müller G., Patthy L., Soller M., Varga L. (1998). A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. Mamm. Genome, 9, 671-672.

- Tajbakhsh S., Borello U., Vivarelli E., Kelly R., Papkoff J., Duprez D., Buckingham M., Cossu G. (1998). Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. Development, **125**, 4155-4162.
- Tajbakhsh S., Buckingham M. (1994). Mouse limb muscle is determined in the absence of the earliest myogenic factor myf-5. Dev. Biol., **91**, 747-751.
- Tajbakhsh S., Rocancourt D., Buckingham M. (1996). Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. Nature, **384**, 266-270.
- Tajbakhsh S., Rocancourt D., Cossu G., Buckingham M. (1997). Redefining the Genetic Hierarchies Controlling Skeletal Myogenesis: Pax-3 and Myf-5 Act Upstream of MyoD. Cell, **127**, 127-138.
- Taylor W.E., Bhasin S., Artaza J., Byhower F., Azam M., Willard D.H.Jr., Kull F.C.Jr., Gonzalez-Cadavid N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. Am. J. Endocrinol. Metab., **280**, E221-E228.
- Terry K., Magan H., Baranski M., Burrus L.W. (2000). Sfrp-1 and sfrp-2 are expressed in overlapping and distinct domains during chick development. Mech. Dev., **97**, 177-182.
- Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., Bass J., Kambadur R. (2000). Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. J. Biol. Chem., **275**(51), 40235-40243.
- Trexler M., Banyai L., Patthy L. (2001). A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **98**(7), 3705-3709.
- Trexler M., Bányai L., Patthy L. (2002). Distinct Expression Pattern of Two Related Human Proteins Containing Multiple Types of Protease-Inhibitory Modules. Biol. Chem., **383**, 223-228.
- Tsuchida K., Arai K.Y., Kuramoto Y., Yamakawa N., Hasegawai Y., Sugino H. (2000). Identification and Characterization of a Novel Follistatin-like Protein as a Binding Protein for the TGF-beta Family. J. Biol. Chem., **275**(52), 40788-41796.
- Uchiyama K., Ishikawa A., Hanaoka K. (2000). Expression of Lbx1 Involved in the Hypaxial Musculature Formation of the Mouse Embryo. J. Exp. Zool., **286**, 270-279.
- Valdez M.R., Richardson J.A., Klein W.H., Olson E.N. (2000). Failure of Myf5 to Support Myogenic Differentiation without Myogenin, MyoD, and MRF4. Dev. Biol., **219**, 287-298.
- Van Swearingen J., Lance-Jones C. (1995). Slow and fast muscle fibers are preferentially derived from myoblasts migrating into the chick limb bud at different developmental times. Dev. Biol., **170**, 321-337.
- Venuti J.M., Morris J.S., Vivian J.L., Olson E.N., Klein W.H. (1995). Myogenin Is Required for Late but Not Early Aspects of Myogenesis during Mouse Development. J. Cell Biol., **128**(4), 563-576.
- Wagner K.R., Liu X., Chang X., Allen R.E. (2005). Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **102**(7), 2519-2524.
- Wagner K.R., McPherron A.C., Winik N., Lee S.-J. (2002). Loss of Myostatin Attenuates Severity of Muscular Dystrophy in mdx Mice. Ann. Neurol., **52**, 832-836.

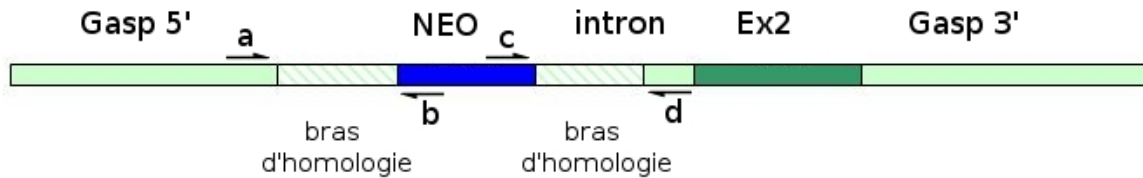
- Wang H., Zhang Q., Zhu D. (2003). hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 311, 877-883.
- Wang J., Walsh K. (1996). Inhibition of Retinoblastoma Protein Phosphorylation by Myogenesis-induced Changes in the Subunit Composition of the Cyclin-dependent Kinase 4 Complex. Cell Growth Differ., 7, 1471-1478.
- Webb E.C., De Smet S., Van Nevel C., Martensac B., Demeye D.I. (1998). Effect of Anatomical Location on the Composition of Fatty Acids in Double-Muscled Belgian Blue Cows. Meat Science, 50(1), 45-53.
- Webb S.E., Lee K.K.H., Tang M.K., Ede D.A. (1997). Fibroblast Growth Factors 2 and 4 Stimulate Migration of Mouse Embryonic Limb Myogenic Cells. Dev. Dyn., 209, 206-216.
- Wegner J., Albrecht E., Fiedler I., Teuscher F., Papstein H.-J., Ender K. (2000). Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. J. Anim. Sci., 78, 1485-1496.
- Whittemore L.-A., Song K., Li X., Aghajanian J., Davies M., Girgenrath S., Hill J.J., Jalenak M., Kelley P., Knight A., Maylor R., O'Hara D., Pearson A., Quazi A., Ryerson S., Tan X.-Y., Tomkinson K.N., Veldman G.M., Widom A., Wright J.F., Wudyka S., (2003). Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. Biochem. Biophys. Res. Commun., 300, 965-971.
- Wiener P., Smith J.A., Lewis A.M., Wooliams J.A., Willians J.L. (2002). Muscle-related traits in cattle: The role of the myostatin gene in the South Devon breed. Genet. Sel. Evol., 34, 221-232.
- Wolfman N.M., McPherron A.C., Pappano W.N., Davies M.V., Song K., Tomkinson K.N., Wright J.F., Zhao L., Sebald S.M., Greenspan D.S., Lee S.-J. (2003). Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 100(26), 15842-15846.
- Xie X., Lu J., Kulbokas E.J., Golub T.R., Mootha V., Lindblad-Toh K., Lander E.S., Kellis M. (2005). Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. Nature, 434, 338-345.
- Xu C., Wu G., Zohar Y., Du S.-J. (2003). Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. J. Exp. Biol., 206, 4067-4079.
- Yaffe D., Saxel O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature, 270, 725-727.
- Yamamoto M., Gotoh Y., Tamura K., Tanaka M., Kawakami A., Ide H., Kuroiwa A. (1998). Coordinated expression of Hoxa-11 and Hoxa-13 during limb muscle patterning. Development, 125, 1325-1335.
- Yang J., Ratovitski T., Brady J.P., Solomon M.B., Wells K.D., Wall R.J. (2001). Expression of Myostatin Pro Domain Results in Muscular Transgenic Mice. Mol. Reprod. Dev., 60, 351-361.
- Zhang M., McLennan I.S. (1998). Primary Myotubes Preferentially Mature Into Either the Fastest or Slowest Muscle Fibers. Dev. Dyn., 213, 147-157.
- Zhao Y., Samal E., Srivastava D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature, 436, 214-220.

- Zhu X., Hadhazy M., Wehling M., Tidball J.G., McNally E.M. (2000). Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. FEBS Lett., 474, 71-75.
- Zhu X., Topouzis S., Liang L.-F., Stotish R.L. (2004). Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. Cytokine, 26, 262-272.
- Zimmers T.A., Davies M.V., Koniaris L.G., Haynes P., EsquelaA.F., Tomkinson K.N., McPherron A.C., Wolfman N.M., Lee S.-J. (2002). Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. Science, 296, 1486-1488.



# Annexe 1

## Vérification du clone ES recombinant en 5' et 3' par séquençage



**Gasp KO A**  
 CTTAGCCCGACATCCATTCCCACTGAGGAACTTGGTGCAGGGTGGGACTGGTGTGAGTGGGGTTGGGTCAACAAGAGGTCTGGGTTGGTGGGAAAC  
 CTTAGCCCGACATCCATTCCCACTGAGGAACTTGGTGCAGGGTGGGACTGGTGTGAGTGGGGTTGGGTCAACAAGAGGTCTGGGTTGGTGGGAAAC

**Gasp KO A**  
 TTCAGAATAGCCCTTAAGAAACAAGCTTCAAGGCAAGGTAAGAAGGGGAGGTCTCCGTGGGTTTGGAGGGGGGGAGCTTGCCAGAATTCATAGT  
 TTCAGAATAGCCCTTAAGAAACAAGCTTCAAGGCAAGGTAAGAAGGGGAGGTCTCCGTGGGTTTGGAGGGGGGGAGCTTGCCAGAATTCATAGT

**Gasp KO A**  
 ACAGAAAATACAG  
 ACAGAAAATACAG

**Gasp KO B**  
 CCCCCGCCCCGCAAGCTCGCGTCTGCAAGGACGTGACAAATGGAAATGACACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGA  
 CCCCCGCCCCGCAAGCTCGCGTCTGCAAGGACGTGACAAATGGAAATGACACGTCTCACTAGTCTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGA

**Gasp KO B**  
 AGCGGGTAGGCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAAGCTTGGCTCTCCGTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAAGGGTGGGTCCGGGGCGGGCTCA  
 AGCGGGTAGGCTTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAAGCTTGGCTCTCCGTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAAGGGTGGGTCCGGGGCGGGCTCA

**Gasp KO B**  
 GGGGGGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAAGTCTCCGGAAGGCGGCGGCTTCTGCAAGCTTCAAAAAGCAGCAGTCTGCCGCGCTGTTCTCCT  
 GGGGGGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGCCGAAAGTCTCCGGAAGGCGGCGGCTTCTGCAAGCTTCAAAAAGCAGCAGTCTGCCGCGCTGTTCTCCT

**Gasp KO B**  
 CTTCTCATCTCCGGGCTTTGACCTGCAAGCAGCAATATGGGATCGGCGATTGAAACAAGATGGATTGCAAGCAGAGTCTCCGGCGCTTGGGTGGAG  
 CTTCTCATCTCCGGGCTTTGACCTGCAAGCAGCAATATGGGATCGGCGATTGAAACAAGATGGATTGCAAGCAGAGTCTCCGGCGCTTGGGTGGAG

**Gasp KO B**  
 AGGCTATTGGGCTATGACTGGGCAACAAGCAATCGGCTGCTGATGCCGCGTGTTCGGGCTGTCAAGCAGAGGGGCGCCGGT  
 AGGCTATTGGGCTATGACTGGGCAACAAGCAATCGGCTGCTGATGCCGCGTGTTCGGGCTGTCAAGCAGAGGGGCGCCGGT

**Gasp KO C**  
 AGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCAAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGAAGA  
 AGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCAAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGAAGA

**Gasp KO C**  
 TCTTCTGAGGGGATCAATTCTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGGCCCTCCCCGCTGCCTT  
 TCTTCTGAGGGGATCAATTCTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGGCCCTCCCCGCTGCCTT

**Gasp KO C**  
 CCTTGAACCTGGAAAGTGCACCTCCACTGTCTTTCTAATAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTGGTGTCTATTCTATTCTGGGG  
 CCTTGAACCTGGAAAGTGCACCTCCACTGTCTTTCTAATAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTGGTGTCTATTCTATTCTGGGG

**Gasp KO C**  
 GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAAGCAATA  
 GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAAGCAATA

**GASP KO D**  
 TAAAATTTTCTCTCCCTTGAAGCTCAGCTCTGGATGTGACCCATCTCTGTCTCAAAGCTTCCCCTGTTGTGGCCAGAAAGCTATGCCAAAAG  
 TAAAATTTTCTCTCCCTTGAAGCTCAGCTCTGGATGTGACCCATCTCTGTCTCAAAGCTTCCCCTGTTGTGGCCAGAAAGCTATGCCAAAAG

**GASP KO D**  
 GGCTTCAAAAAGAAAGTCTTATTCTGAACTGAAAGGGGGAGAAAGTAAACAAAGTCTGAGCGCCAGCAGCTCCACACAGCCGGTGGGGGTGTTT  
 GGCTTCAAAAAGAAAGTCTTATTCTGAACTGAAAGGGGGAGAAAGTAAACAAAGTCTGAGCGCCAGCAGCTCCACACAGCCGGTGGGGGTGTTT

**GASP KO D**  
 CCCCCGCTTACCCATGTGGAATGTCAAGAAAGGCTGAAATCAAAAGTGGGAAAGCAAGAGGCCAGTGTGGTGGGGACTAATTCAACAAGTCACTAC  
 CCCCCGCTTACCCATGTGGAATGTCAAGAAAGGCTGAAATCAAAAGTGGGAAAGCAAGAGGCCAGTGTGGTGGGGACTAATTCAACAAGTCACTAC

**GASP KO D**  
 CTGGTGGAGGATTAAGACCCAGCCAGCTGCCAGCCACACGGTGTGACATTGTGCAAAAGCACA  
 CTGGTGGAGGATTAAGACCCAGCCAGCTGCCAGCCACACGGTGTGACATTGTGCAAAAGCACA

Les séquences réalisées (A, B, C, D) correspondent bien à celle de référence (Gasp KO), donc ce clone s'avère bien recombinant en 5' et 3'.







## Résumé

La formation des muscles squelettiques est un processus complexe impliquant différentes étapes de différenciation, de prolifération, et de fusion ainsi que de nombreux facteurs moléculaires. Parmi ces derniers, la myostatine (Gdf8) est un régulateur négatif de la prolifération et de la différenciation des myoblastes, et l'absence d'une protéine fonctionnelle conduit à une remarquable augmentation de la masse musculaire. La myostatine, membre de la superfamille des TGF $\beta$ , est sécrétée sous la forme d'un précurseur. De nombreuses études sur la voie de signalisation de la myostatine ont permis de caractériser différents inhibiteurs de Gdf8 comme par exemple son propeptide ou la follistatine. Récemment, Gasp1 a été identifié comme nouveau partenaire de la myostatine, agissant comme un régulateur négatif de l'action de Gdf8. Afin de mieux connaître le rôle de Gasp1, en particulier au cours de la myogenèse, nous l'avons invalidé chez la souris par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires. L'établissement des souris knockout Gasp1<sup>-/-</sup> nous permet maintenant d'aborder les aspects fonctionnels du gène *Gasp1*. Des études préliminaires révèlent que les homozygotes sont viables et ne présentent pas de défauts de croissance. D'autre part, l'expression de *Gasp1* a été étudiée de manière spatio-temporelle au cours du développement embryonnaire grâce à des expériences d'hybridation *in situ* sur des embryons murins *in toto* et quantifiée en PCR quantitative au cours de la prolifération et différenciation myogénique.

Mots-clés: Gasp1, myostatine, modèle animal, développement musculaire

## Abstract

Skeletal muscle formation is a complex process that involves the proliferation, alignment and fusion of myogenic precursor cells to form multinucleated myotubes that will subsequently mature into muscle fibers. A number of regulatory factors involved in these different steps have been identified. Among them, Myostatin (Gdf8), a member of TGF $\beta$  super-family is a negative regulator of myoblast proliferation and differentiation. The lack of a functional protein leads to remarkable muscle mass growth. Several Gdf8 inhibitors like the propeptide or the follistatin protein. Recently, Gasp1 was identified as a new myostatin partner, acting as a negative regulator of myostatin activity. To get more insights on Gasp1 functions, especially in myogenesis, we have used homologous recombination to effect the targeted disruption of the *Gasp-1* gene in mouse embryonic stem cells. *Gasp1*<sup>-/-</sup> knock-out mouse provides us an excellent tool to conduct functional studies. Preliminary analyses show the viability of homozygotes without growth defects. In parallel, *Gasp1* expression has been studied in spatio-temporal manner during embryogenesis by *in situ* hybridization on mouse embryo and quantified by quantitative PCR during myogenic proliferation and differentiation.

Key words: Gasp1, myostatin, animal model, muscular development