

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie, Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Laboratoire : Unité de Génétique Moléculaire Animale-UMR INRA 1061

Thèse N° 4-2012

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Génomique et génétique moléculaire

présentée et soutenue par

Olivier MONESTIER

le 17 février 2012

Développement et caractérisation de deux modèles murins présentant un phénotype hypermusclé

Thèse dirigée par le **Pr Véronique BLANQUET**

JURY :

Rapporteurs : **Dr Anne BONNIEU**, Chargée de recherche, INRA Montpellier

Dr Helge AMTHOR, Maître de conférences-praticien hospitalier, Institut de myologie, Paris

Examineurs : **Dr Florian GUILLOU**, Directeur de recherche, INRA Tours

Dr Daniel PETIT, Maître de conférences, Université de Limoges

Pr Véronique BLANQUET, Professeur, Université de Limoges

Pr Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie, Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Laboratoire : Unité de Génétique Moléculaire Animale-UMR INRA 1061

Thèse N° 4-2012

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Génomique et génétique moléculaire

présentée et soutenue par

Olivier MONESTIER

le 17 février 2012

Développement et caractérisation de deux modèles murins présentant un phénotype hypermusclé

Thèse dirigée par le **Pr. Véronique BLANQUET**

JURY :

Rapporteurs : **Dr Anne BONNIEU**, Chargée de recherche, INRA Montpellier

Dr Helge AMTHOR, Maître de conférences-praticien hospitalier, Institut de myologie, Paris

Examineurs : **Dr Florian GUILLOU**, Directeur de recherche, INRA Tours

Dr Daniel PETIT, Maître de conférences, Université de Limoges

Pr Véronique BLANQUET, Professeur, Université de Limoges

Pr Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

A ma femme,

mon fils

et mes parents

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier ma directrice de thèse Véronique BLANQUET pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour son encadrement au cours de ces trois années de thèse. Elle m'a accordé sa confiance pour réaliser ces différents projets et j'espère m'en être montré digne.

Je remercie également le directeur de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale Abderrahman MAFTAH pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour ses précieux conseils sur des sujets variés tels que la recherche, l'enseignement ou l'organisation du séminaire des thésards ainsi que pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite également remercier Anne BONNIEU et Helge AMTHOR pour avoir accepté d'être mes rapporteurs ainsi que Florian GUILLOU pour avoir accepté d'être examinateur.

Un grand merci aux personnes sans lesquelles ces trois ans n'auraient pas été si riches scientifiquement et humainement :

Caroline BRUN pour sa bonne humeur, son aide précieuse et ses bonnes idées ainsi que pour avoir assisté à mon mariage. Notre association scientifique a été très prolifique malgré mes accouplements de souris jugés "peu judicieux".

Katy HEU pour sa gentillesse et sa disponibilité (et ses blagues). Je pense que Katy m'a rendu au moins un service par jour depuis son arrivée au laboratoire.

Un merci particulier à toutes mes "colocataires de bureau" Mélanie MALHOUROUX pour son aide technique très précieuse et Marie-Clémence CHEVALLIER pour ses conseils et sa bonne humeur.

J'aimerais également remercier tous les étudiants qui sont passés par l'UGMA tout au long de mes trois années de thèse pour les bons moments que nous avons passé ensemble : Antoine, Vincent, Benoît, Sophie, Ousmane, Chloé, Almine et tous ceux que j'oublie.

Par ailleurs, je remercie Laëtitia MAGNOL et Lionel FORESTIER pour leur aide et leurs conseils précieux.

Un très grand merci à Daniel PETIT pour le temps qu'il m'a accordé durant la réalisation de notre projet de recherche, pour avoir accepté d'être examinateur de ma thèse et pour sa bonne humeur permanente.

Pour finir je tiens à remercier toute ma famille, en particulier mes parents qui m'ont toujours soutenu, mes grands-parents et mes deux petits neveux : Mathis et Adrien.

Et bien entendu, un grand merci à ma femme SANDRINE pour son soutien depuis plus de dix ans et à mon fils MAXIME qui est né au début de ma thèse et entre à l'école au moment où je la rédige, tout un symbole.

Tous les membres de l'UGMA m'ont un jour ou l'autre rendu service au cours de ces trois années de thèse. Je ne peux bien sûr pas tous les citer (je risque de faire des oublis) je tiens donc à tous les remercier chaleureusement.

Merci

Publications et communications

Publications

- Magnol L., Monestier O., Vuillier-Devillers K., Wagner S., Cocquempot O., Chevallier M.C. and Blanquet V., A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome : study of muscle characteristics. *Animal* (2010)
- Monestier O., Brun C., Heu K., Passet B., Malhouroux M., Magnol L., Vilotte J.L. and Blanquet V., In vivo characterization of the role of *Gasp1* in skeletal muscle function (soumis à BMC Genomics)
- Monestier O., Brun C., Cocquempot O., Petit D., Blanquet V., GASP/WFIKKN proteins : evolutionary aspects of their functions (soumis à PLoS ONE)

Communications écrites

- Olivier Monestier, Marie-Clémence Chevallier, Laetitia Magnol, et Véronique Blanquet, Analyse phénotypique et moléculaire d'une lignée murine présentant un fort développement musculaire, 2ème journée scientifique de l'IFR GEIST, Limoges (29/01/2009)
- Fabien Lechouane, Olivier Monestier, Michel Cogné et Christophe Sirac, Détermination des éléments minima permettant la commutation de classe des immunoglobulines, 2ème journée scientifique de l'IFR GEIST, Limoges (29/01/2009)
- Olivier Monestier, Véronique Blanquet, Analyse phénotypique et moléculaire d'une lignée murine présentant un fort développement musculaire, 11ème séminaire des thésards du département de génétique animale, Jouy-en-Josas (2009)
- Caroline Brun, Olivier Monestier, Laëtitia Magnol, Véronique Blanquet, Characterisation of new proteins associated with GASP-1 in muscular tissue, 14ème séminaire des thésards du département de génétique animale, Limoges (5 et 6 avril 2011)
- Olivier Monestier, Caroline Brun, Katy Heu, Mélanie Malhouroux, Karine Vuillier-Devillers, Laëtitia Magnol, Véronique Blanquet, Ubiquitous *Gasp-1* overexpression in mice leads to a hypermuscular phenotype without any obvious effect on other organs, Myologie 2011, Lille, France (9-13 May 2011)
- Olivier Monestier, Caroline Brun, Katy Heu, Mélanie Malhouroux, Karine Vuillier-Devillers, Laëtitia Magnol and Véronique Blanquet, Contribution of mouse models to analyse muscle characteristics in cattle, ISAFG 2011, Dublin, Ireland (10-12 october)

Communication orale

- Contribution du modèle murin à l'analyse des caractéristiques musculaires chez le bovin, 12ème séminaire des thésards du département de génétique animale, Pornichet (6 et 7 avril 2010)

Liste des abréviations

aa : acide aminé	dpf : days post fecondation
AAV1 : adeno-associated virus 1	E : embryon
ActRIIB : activin receptor type-2B	ENU : éthyl-nitroso-urée
ADN : acide désoxyribonucléique	ERK : extracellular signal-regulated kinase
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	EYA : eyes absent
ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondrial	FGF : fibroblast growth factors
AMPK : AMP-activated protein kinase	FLRG : follistatin-related gene protein
ARE : androgen esponse element	FOXO : forkhead box O
ARNm : acide ribonucléique messenger	FS : follistatine
ATP : adénosine triphosphate	FSD : follistatin domain
BMP : bone morphogenetic protein	FST : follistatine
BMP11 : bone morphogenetic protein 11, également appelé GDF11.	FSTL3 : follistatin-like 3, également appelé FLRG
BMP2 : bone morphogenetic protein 2	GASP1 : growth and differentiation factor associated serum protein-1
BPCO : brocho-pneumopathie chronique obstructive	GASP2 : growth and differentiation factor associated serum protein-2
Ca²⁺ : ion calcium	GDF11 : growth differentiation factor 11, également appelé BMP11
CCND1 : cycline d1	GDF8 : growth differentiation factor 8
CCNE1 : cycline e1	GFP : green fluorescent protein
CDK : cyclin dependent kinase	GH : hormone de croissance
CMV : cytomégalovirus	GRE : glucocorticoid response element
CT : cycle threshold RQ	GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta
CYP2B : cytochrome P450 2B	Het : hétérozygote
DHEA : déhydroépiandrostérone	Hom : homozygote
DHPRα1S : dihydropyridine-sensitive receptor alpha 1S	HOX : homeobox protein
DM : double musculature	hSGT : human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein
DMRT2 : doublesex and mab-3 related transcription factor 2	Ig : immunoglobuline
dpc : days post <i>coitum</i> (jpc)	IGF : insuline like growth factor
	IL : interleukine

I-SMAD : inhibitor SMAD
JNK : jun N-terminal kinase
jpc : jours post *coitum*
kb : kilobase = 1000pb
KO : knockout
LAP : latency associated peptide
LTBP3 : latent transforming growth factor beta binding protein 3
MAPK : mitogen-activated protein kinase
Mb : megabase = 1000 kb
MEF2 : myocyte enhancer factor 2
MEIS : myeloid ecotropic viral integration site
mh : muscle hypertrophy
miR : microARN
miRNA : microARN
MKK6 : mitogen-activated protein kinase kinase 6
MRF : myogenic regulatory factors
MRF4 : muscle specific regulatory factor 4, également appelé MYF6
MSC : musculine, également appelée MYOR
MSTN : myostatine, également appelé GDF8
mTOR : mammalian target of rapamycin
MURF : muscle-upregulated RING finger ubiquitin ligase
MYF5 : myogenic factor 5
MYF6 : myogenic factor 6
MyHC : myosin heavy chain
MYOD : myoblast determination protein 1
MYOR : myogenic repressor également appelé musculine
NFAT : calcineurin-nuclear factor of activated T cells
NFκB : nuclear factor kappa B
nt : nucléotide

NTR : nétrine
PAX : paired box protein
pb : paire de base
PCR : polymerase chain reaction
pH : potentiel hydrogène
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PITX2 : pituitary homeobox 2
PPARγ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma
R-SMAD : regulatory Smad
SHH : sonic hedgehog
SIDA : syndrome d'immuno-déficience acquise
SIX : sine oculis homeobox homologue
snRNA : small nuclear ribonucleic acid
SNP : single nucleotide polymorphism
SV2A : synaptic vesicle protein 2A
TAK1 : TGF-beta activated kinase 1
TBX1 : T-box transcription factor 1
TCF21 : transcription factor 21, également nommé Capsuline
TGFβ : transforming growth factor-beta
TLDA : taqman low-density array
TNF : tumor necrosis factor
TRE : thyroïd hormon response element
UTR : untranslated region
WAP : whey acidic protein
WFIKKN1 : WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 1, également appelé GASP2
WFIKKN2 : WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 2; également appelé GASP1
WGD : whole genome duplication
WNT : wingless
Wt : wild type

Sommaire

Remerciements	3
Publications et communications.....	5
Publications	5
Communications écrites	5
Communication orale	5
Liste des abréviations	7
Sommaire	9
Avant-propos	11
Exposé bibliographique.....	13
I-Formation du muscle squelettique au cours du développement embryonnaire : Première phase de la myogenèse	15
I-1-Régulations intracellulaires pendant la myogenèse	15
I-1-a-Formation des muscles du tronc et des membres, importance de PAX3	16
I-1-b-Formation des muscles du crâne	18
I-2-Régulation de la myogenèse par des facteurs sécrétés	18
I-3-Rôle des microARN dans la myogenèse	20
II-Croissance fœtale du muscle squelettique : seconde phase de la myogenèse.....	21
III-Croissance et réparation postnatales des fibres musculaires : Troisième phase de la myogenèse	22
IV-Anatomie et structure du muscle squelettique	27
V-Les différents types de fibres musculaires	31
VI-Les pathologies du muscle squelettique et les phénotypes d'hypermusculature	34
VI-1-Les maladies neuromusculaires	34
VI-2-Les cachexies.....	37
VI-3-La malnutrition	37
VI-4-La sarcopénie.....	38
VI-5-Les phénotypes d'hypermusculature chez les animaux d'élevage.....	40
VI-5-a-Le phénotype Double Musculature (DM) chez le bovin.....	40
VI-5-b-Le phénotype DM chez les autres animaux d'élevage.....	44
VII-La myostatine	45
VII-1-Structure et fonction.....	45
VII-2-Régulation de la myostatine	49
VII-3-Rôle dans les phénotypes d'hypermusculature	53
VII-4-Rôle dans les pathologies du muscle squelettique	56
VIII-GASP1 et GASP2	57
IX-But et stratégie d'étude	62
Chapitre 1 : Etude <i>in vivo</i> du rôle de <i>Gasp1</i> dans le muscle	63
Publication 1: <i>In vivo</i> characterization of the role of <i>Gasp1</i> in skeletal muscle function....	67
Résultats complémentaires	88
Matériels et méthodes.....	88
Résultats et discussion.....	91
Chapitre 2 : Aspects évolutifs des fonctions de GASP1 et GASP2	93
Publication 2: GASP/WFIKK proteins: evolutionary aspects of their functions.....	97

Chapitre 3 : Analyses phénotypique et moléculaire d'une lignée de souris ENU : la lignée GMA06.....	119
Crible de mutagenèse à l'éthyl-nitroso-urée (ENU)	121
Publication 3 : A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome: study of muscle characteristics.....	125
Discussion générale.....	127
Bibliographie.....	133
Annexes.....	147
Annexe 1-Liste des principales maladies neuromusculaires.....	149
Annexe 2-Classification des carcasses de grands bovins.....	154
Table des Matières	156
Table des illustrations.....	158
Table des tableaux	159

Avant-propos

Une des caractéristiques principales du règne animal est la capacité de mouvement, même si pour certains organismes, il se limite à certaines phases du développement. Pour assurer ce mouvement, une structure complexe a été développée au cours de l'évolution : le muscle strié. Migration larvaire, vol, reproduction, alimentation, circulation du sang sont autant d'éléments dépendant de la contraction musculaire. Si le muscle cardiaque est essentiel à la vie, le muscle squelettique a une part très importante dans l'organisation des vertébrés. Chez l'homme par exemple, on dénombre 570 muscles squelettiques, représentant 40% du poids de corps d'un individu. Leur fonction physiologique est bien évidemment d'assurer la motricité, sous le contrôle du système nerveux (locomotion, maintien et changement de posture). Les pathologies du tissu musculaire peuvent être multiples et très handicapantes (maladies neuromusculaires, cancers du muscle, infections toxicologiques, traumatismes par le sport ou accidents). Mieux comprendre le muscle, son fonctionnement, son développement, sa régénération, ses traumatismes, ses pathologies et son vieillissement, dans le but de mieux le soigner, représentent des enjeux essentiels.

L'étude du développement musculaire présente également un intérêt agronomique, le muscle squelettique étant à l'origine de la viande. Le déterminisme génétique de caractères liés à la qualité et à la quantité des viandes obtenues à partir de carcasses de diverses races bovines fait l'objet de nombreuses études ces dernières années qui ont déjà permis de valider ou non un certain nombre de gènes associés à la tendreté, au persillage ou encore la croissance.

Dans ce contexte, mon travail de thèse au sein de l'équipe « Développement musculaire et animaux modèles » animé par le Pr. V Blanquet s'est inscrit dans un projet global qui consiste à mieux comprendre l'étude du déterminisme génétique des caractéristiques musculaires chez le bovin par des approches de mutagenèse chez la souris, et tout particulièrement l'hypermusculature. L'équipe développe des modèles murins en vue de l'identification de nouveaux candidats et d'études fonctionnelles de gènes d'intérêt en rapport avec la croissance musculaire. En effet, l'identification de gènes orthologues et la conservation des génomes (séquences et fonctions) entre différentes espèces permettent d'envisager une étude sur des animaux modèles comme la souris. Ceci nous permet

d'appréhender le développement du muscle chez les mammifères en utilisant un modèle ayant un temps de génération plus court et des possibilités d'expérimentation simplifiées par rapport à des animaux de taille supérieure. Les résultats obtenus peuvent être ensuite transposés aux animaux d'élevage comme le bovin, ou à l'homme.

La myostatine (MSTN ou GDF8), régulateur négatif de la prolifération et de la différenciation des myoblastes, est un élément clé du développement musculaire. L'action de ce facteur de croissance est soumise à une régulation fine reposant, en particulier, sur différents inhibiteurs. Au cours de mon travail de thèse, je me suis intéressé à cette voie de signalisation de la myostatine en créant et caractérisant deux modèles murins présentant un phénotype hypermusclé, un ayant été généré par transgénèse additive et l'autre étant issu d'un crible de mutagenèse chimique basé sur une sensibilisation du fond génétique grâce à l'utilisation des souris knockout pour *Gdf8*.

Dans ce manuscrit, je présente en introduction la génétique, la physiologie normale et pathologique du développement et de la croissance du muscle squelettique ainsi que le rôle clé de la myostatine dans ce processus. Je développe ensuite les connaissances actuelles sur un des inhibiteurs de la myostatine, la protéine GASP1 (Growth and differentiation factor Associated Serum Protein-1). La description de mes travaux s'organise ensuite en trois chapitres : le premier décrit la création et la caractérisation d'une souris surexprimant de façon ubiquitaire le gène *Gasp1* afin de mieux cerner son rôle dans l'organisme et, plus particulièrement lors du développement musculaire (Monestier *et al.*, soumis à BMC Genomics) ; le second se concentre sur une étude phylogénétique visant à comparer l'évolution de la protéine GASP1 et de son homologue GASP2, ainsi que l'évolution de leurs fonctions des premiers métazoaires aux vertébrés (Monestier *et al.*, soumis à PloS ONE) ; enfin, le troisième concerne l'étude phénotypique et moléculaire d'une lignée de souris ENU présentant un phénotype hypermusclé obtenue lors du crible sensibilisé que nous avons mis en place pour conduire des analyses fonctionnelles de gènes modificateurs du phénotype GDF8 (Magnol L, Monestier *et al.* Animal, 2011). L'ensemble de ces résultats me permet de proposer dans la discussion générale de nouvelles pistes de travail sur la protéine GASP1, notamment de déterminer quel pourrait être son rôle hors du développement musculaire et si elle pourrait agir indépendamment de la voie de signalisation de la myostatine.

Exposé bibliographique

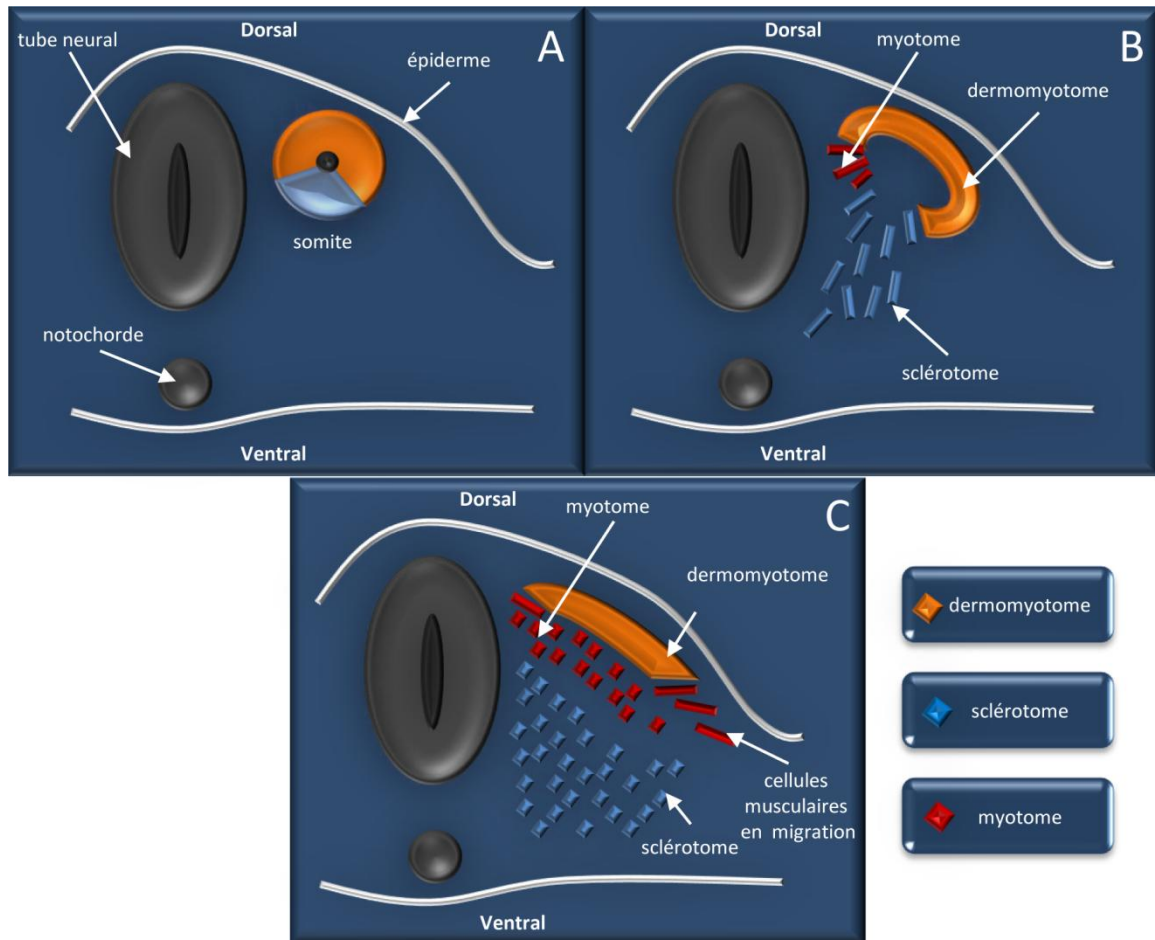


Figure 1 : formation du myotome (d'après Gilbert, Developmental Biology 6th edition)

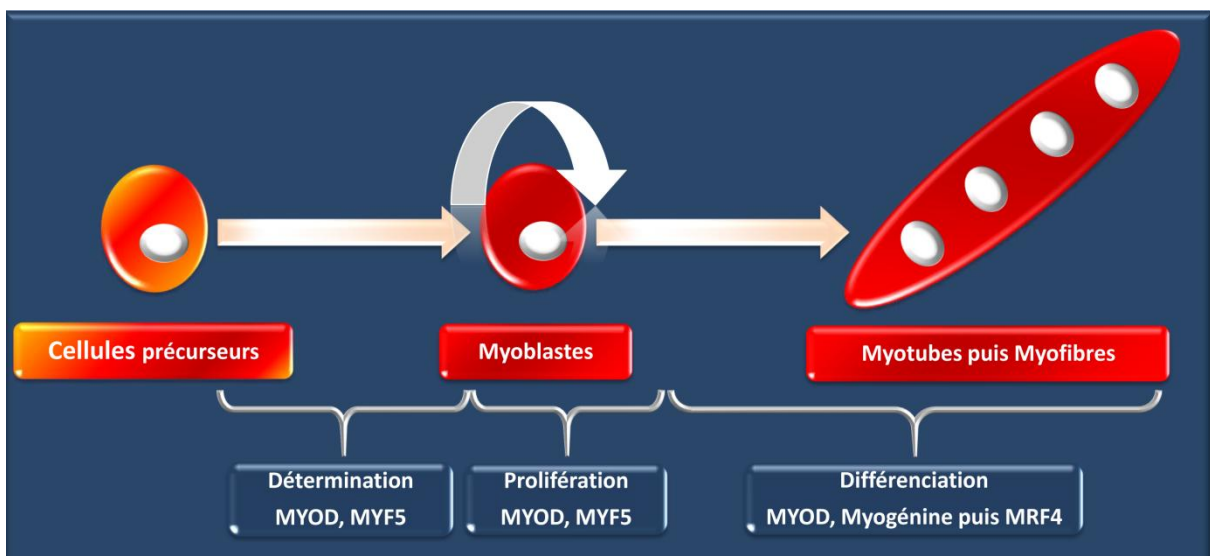


Figure 2 : rôles des MRFs durant la myogenèse chez les vertébrés

I-Formation du muscle squelettique au cours du développement embryonnaire : Première phase de la myogenèse

La mise en place du muscle squelettique au cours du développement embryonnaire, la myogenèse, est une succession d'évènements morphogénétiques très régulés basée sur la sécrétion de facteurs déclenchant des cascades de régulateurs de la transcription qui vont agir sur la prolifération et la différenciation cellulaire (Pownall, Gustafsson, et Emerson 2002, Buckingham 2006, Bothe *et al.* 2007). Les principaux facteurs impliqués lors de la première phase de la myogenèse, aboutissant à la formation des fibres dites primaires, vont être brièvement décrits.

I-1-Régulations intracellulaires pendant la myogenèse

Chez les vertébrés supérieurs, les cellules musculaires commencent à émerger quand la moitié de la période de gestation est atteinte (embryons entre 9 jours (E9) et 12 jours (E12) chez la souris). Elles sont originaires de trois régions de l'embryon correspondant à différentes parties du mésoderme le long de l'axe rostrocaudal : le mésoderme préchordal, le mésoderme paraxial crânien (qui donne les muscles du crâne), et le mésoderme paraxial segmenté également appelé somite (qui va donner les muscles du tronc et des membres). La formation des muscles crâniens et celle des muscles « axiaux » sont différentes (Braun et Gautel 2011)

Les somites se trouvent de chaque côté du tube neural. Ils se différencient en une partie ventrale, le sclérotome, et une partie dorsale, le dermomyotome. Le myotome, qui sera à l'origine des premières fibres musculaires va ensuite être formé par délamination du dermomyotome (Braun et Gautel 2011) (Figure 1).

Les cellules du myotome vont entrer dans la voie myogénique (phase de détermination) et devenir des myoblastes (Figure 2). Ces myoblastes vont ensuite fusionner entre-eux afin de former des myotubes multinucléés (phase de différenciation) qui vont ensuite évoluer en fibres musculaires ou myofibres. Ces différentes étapes allant d'une cellule indifférenciée jusqu'à la fibre musculaire dépendent de voies de signalisation complexes qui aboutissent à l'activation de facteurs de transcription à domaine hélice-boucle-hélice : les facteurs régulateurs myogéniques (Braun et Gautel 2001) (MRFs : myogenic regulatory factors). On distingue quatre MRFs : MYF5 (myogenic factor 5), MRF4 (muscle specific

regulatory factor 4) aussi appelé MYF6, MYOD (myoblast determination protein 1), et la myogénine. MYOD et MYF5 sont nécessaires à la détermination des cellules musculaires alors que la myogénine est plus importante dans la phase terminale de la différenciation (Berkes et Tapscott 2005). MRF4, quant à lui, semble avoir à la fois un rôle dans la détermination et la différenciation des cellules musculaires (Kassar-Duchossoy *et al.* 2005). Si les MRFs sont les éléments finaux de la formation de toutes cellules musculaires différenciées, les signaux agissant en amont et aboutissant à l'activation de ces facteurs de transcription sont différents en fonction de la localisation des cellules (Figure 3).

I-1-a-Formation des muscles du tronc et des membres, importance de PAX3

De nombreux facteurs de transcription comme les PAX (paired box protein), les HOX (homeobox protein), ou encore les protéines T-box ont été identifiés comme agissant en amont des facteurs myogéniques. Cependant, aucune de ces protéines n'est présente uniquement dans le muscle, ce qui suggère la présence de patrons spécifiques de plusieurs facteurs pour induire la myogenèse. Il est possible de distinguer deux types de muscles en fonction de leur innervation : les muscles hypaxiaux (muscles des membres, abdominaux, diaphragme,...) innervés par le rameau ventral des nerfs spinaux et les muscles épiauxiaux (dorsaux, arrière du crâne, ...) innervés par le rameau dorsal des nerfs spinaux. La signalisation en amont de l'activation des MRFs dans ces deux types de muscles est différente mais dépend dans les deux cas de PAX3.

Dans les muscles épiauxiaux, PAX3 active MYF5 en contrôlant l'expression de *Dmrt2* (doublesex and mab-3 related transcription factor 2) qui se fixe sur un enhancer de *Myf5* (Sato *et al.* 2010). On sait également que l'expression de *MyoD* dans ce type de muscle est régulée par la voie WNT par l'intermédiaire de PAX3 (Brunelli *et al.* 2007). Il semble donc que PAX3 puisse activer MYOD et MYF5 et ainsi lancer la différenciation, ce qui confirme les résultats obtenus par Maroto *et al.* (1997) qui avaient mis en évidence l'activation de *MyoD* et *Myf5* après une expression ectopique de *Pax3*.

Dans les muscles hypaxiaux, l'activation des MRFs est différente. PAX3 semble activer MYF5 de manière directe mais pas MYOD. De plus, il a été montré que le produit du gène paralogue de *Pax3*, *Pax7*, est lui aussi capable d'activer MYF5 dans les muscles hypaxiaux (McKinnell *et al.* 2008) alors qu'il n'influe visiblement pas sur le développement des muscles épiauxiaux (Mansouri *et al.* 1996). PAX3 est nécessaire pour la migration des

précurseurs musculaires vers les bourgeons des membres, l'inactivation de *Pax3* entraînant une absence de formation des muscles de ces régions. En revanche l'expression de *Pax3* n'est pas indispensable à la myogenèse, des cellules n'exprimant pas ce gène pouvant se différencier en muscles hypaxiaux normaux (Daston *et al.* 1996). Le fait que PAX3 ne soit pas nécessaire est probablement dû au fait qu'il agisse sur l'expression de *Myf5* en se fixant sur un élément régulateur de 145 pb situé 57,5 kb en amont du gène (Bajard *et al.* 2006) qui permet également la fixation de SIX1 et SIX4 (Sine oculis homeobox homologue 1 et 4), protéines permettant l'activation de MYF5 (Giordani *et al.* 2007).

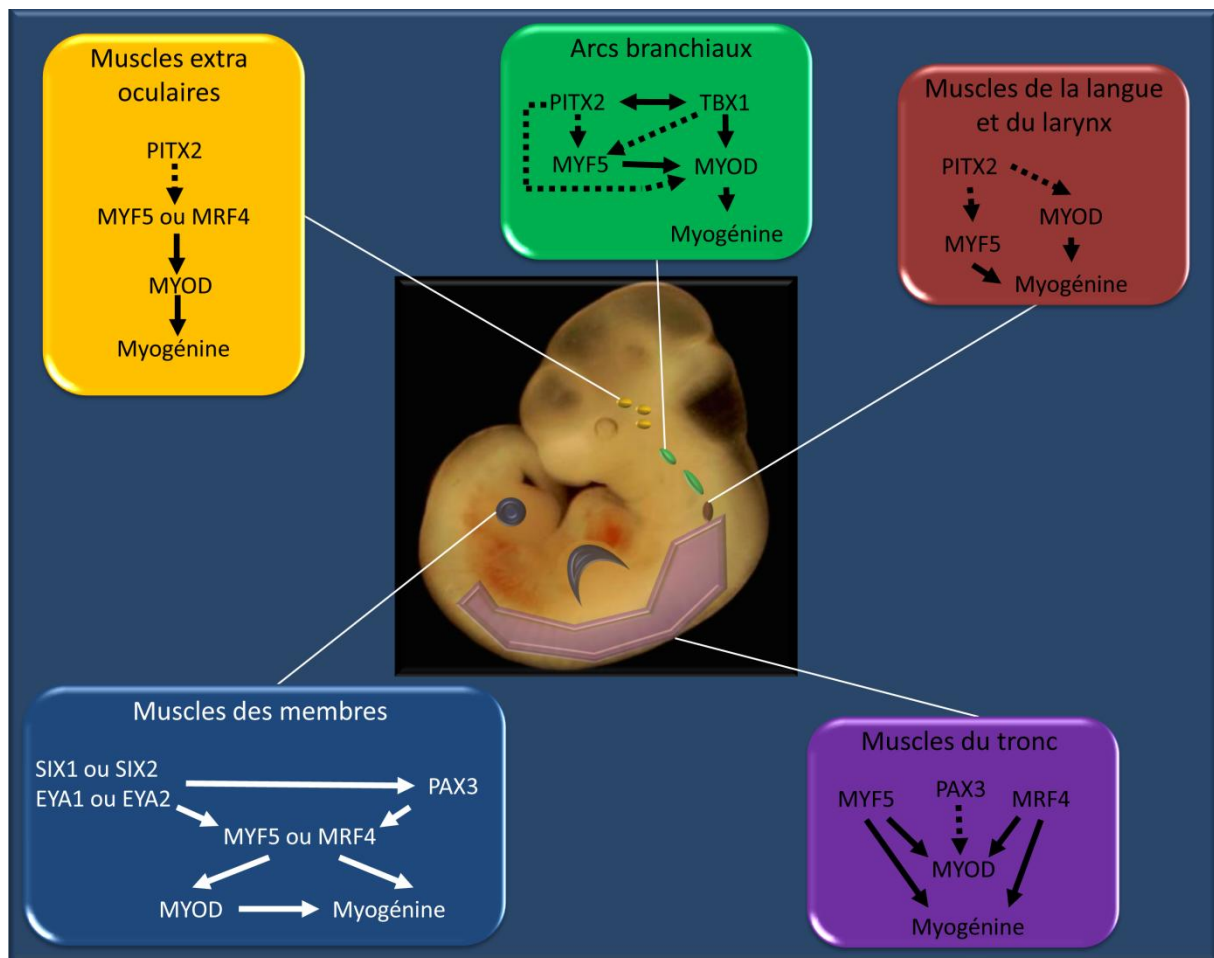


Figure 3 : les différentes cascades de signalisation déclenchant la myogenèse (d'après Braun et Gautel, 2011)

Photo :

Embryon de souris au stade E11, (<http://www.Dreamstime.com/stock-photos-mouse-embryo-day-11-of-development-image744143>).

Les protéines SIX sont très importantes dans la régulation de la myogenèse au niveau des membres. En effet, en plus de leur rôle de régulation de *Myf5*, elles agissent également en amont de PAX3 et PAX7. Ces protéines agissent en formant un complexe avec leurs

coactivateurs : les protéines EYA (eyes absent) (Grifone *et al.* 2004). Grifone *et al.* ont montré en 2005 que les doubles mutants SIX1/SIX4 et EYA1/EYA2 ne présentent aucune expression de *Pax3* dans le dermomyotome hypaxial chez la souris. En revanche, l'activation de *Myf5* dans la région épiaxiale a lieu normalement chez ces animaux. Ceci indique bien que les protéines SIX et EYA sont essentielles à l'expression de *Pax3* pour lancer la myogenèse dans les régions à l'origine des muscles hypaxiaux (Grifone *et al.* 2005).

Le développement du muscle embryonnaire est très régulé et de nombreuses autres protéines, dont nous ne détaillerons pas le rôle ici, sont impliquées dans l'action des MRFs durant la myogenèse comme les protéines MEIS (myeloid ecotropic viral integration site) ou MEF2 (myocyte enhancer factor 2) (pour revue, voir Berkes et Tapscott 2005).

I-1-b-Formation des muscles du crâne

De nombreuses études indiquent que la régulation de la myogenèse dans les muscles de la tête fait appel à des cascades de signalisation différentes de celles mises en jeu dans les muscles du tronc et des membres (Hacker et Guthrie 1998 ; Mootosamy et Dietrich 2002 ; Tzahor *et al.* 2003, Bothe et Dietrich 2006). Dans ce type de muscle, PAX3 et PAX7 ne semblent pas impliquées dans la signalisation. En revanche, quatre autres protéines semblent plus ou moins importantes selon le groupe musculaire concerné (Figure 3) : PITX2 (pituitary homeobox 2), TBX1 (T-box transcription factor 1), la musculine (MSC aussi appelée MYOR, et la capsuline (également nommée TCF21 : transcription factor 21). L'absence de chacune d'entre elles entraînant des défauts de formation de différents muscles de la tête (Lu *et al.* 1999, Lu *et al.* 2002, Kelly, Jerome-Majewska et Papaioannou 2004, Arnold *et al.* 2006, Dong *et al.* 2006, Dastjerdi *et al.* 2007).

I-2-Régulation de la myogenèse par des facteurs sécrétés

Comme cela a été démontré chez le poulet grâce à des ablations précises de certains tissus (Bothe *et al.* 2007, Biressi *et al.* 2007), le début de la myogenèse est dépendant de facteurs sécrétés par des tissus environnants. Les données récentes montrent que la notochorde, le tube neural et une partie de la surface de l'ectoderme sont impliqués dans le processus de myogenèse, la plaque latérale du mésoderme, quant à elle, jouant plutôt un rôle de régulateur négatif dans ce phénomène. Plusieurs facteurs semblent importants dans la mise en place de la myogenèse (Figure 4) : SHH (Sonic Hedgehog), en premier lieu, est sécrété par

la notochorde et la partie ventrale du tube neural, ce qui permet le maintien de l'expression de *Myf5*, il est crucial au développement du muscle embryonnaire chez les mammifères (Munsterberg *et al.* 1995, Chiang *et al.* 1996, Borycki *et al.* 1999). La voie WNT, dont les facteurs sont sécrétés par le tube neural et la surface de l'ectoderme, est également importante : WNT1 et WNT7A, qui agissent via la voie des β -catenines (cadherin-associated protein beta), participent respectivement à l'activation de *Myf5* et *MyoD* (Tajbakhsh *et al.* 1998, Borello *et al.* 2006). Les facteurs Noggin et BMPs (bone morphogenetic proteins) sont également important dans le contrôle temporel de la myogenèse et agissent respectivement en inactivant et activant les récepteurs de la voie des TGF β (transforming growth factor-beta) (Reshef, Maroto et Lassar 1998). Pour terminer, il a été montré chez le poisson zèbre que les FGFs (fibroblast growth factors), notamment FGF8, sont capables de réguler la myogenèse (Groves *et al.* 2005, von Scheven *et al.* 2006).

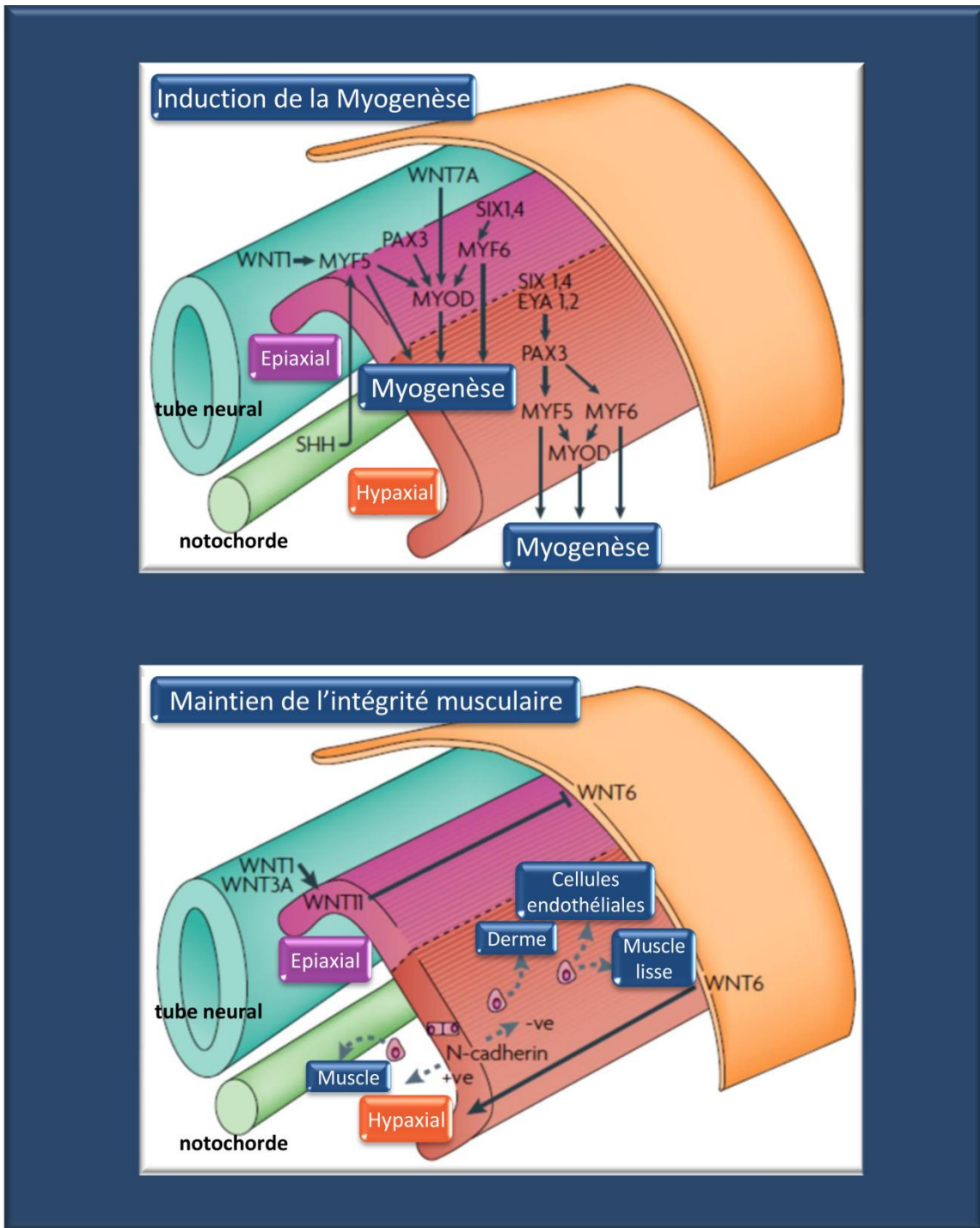


Figure 4 : facteurs sécrétés lors de la première phase de la myogenèse (d'après Bryson Richardson et Currie 2008)

I-3-Rôle des microARN dans la myogenèse

Les microARN (miRNA) sont des ARN non-codants participant à la régulation de l'expression des gènes. Ils diminuent ou suppriment l'expression d'un gène en se fixant à une région généralement située en 3'UTR de l'ARNm dont ils sont complémentaires, puis en

recrutant une machinerie protéique aboutissant à la dégradation de l'ARNm en question. Parmi les nombreux miRNA exprimés dans les muscles squelettiques et cardiaque, seulement quatre sont retrouvés uniquement dans ces tissus: miR-1, miR-133, miR-206 et miR-208. L'expression de ces quatre miRNA semble dépendre de MYF5, MYOD et MEF2 (Chen *et al.* 2006, Rao *et al.* 2006, Liu *et al.* 2007, Sweetman *et al.* 2008).

Le fait que miR-1 et miR-133 ne soient pas exprimés dans les myoblastes indifférenciés et que leur expression augmente sensiblement lors de la différenciation (Boutz *et al.* 2007) semble indiquer que ces derniers soient impliqués dans la régulation de la myogenèse. Cependant, il n'est pas possible d'être catégorique sur le rôle exact des microARN lors du développement musculaire, des réponses seront certainement apportées dans les prochaines années.

II-Croissance fœtale du muscle squelettique : seconde phase de la myogenèse

Pendant la période fœtale (E14,5 à E18,5), on observe une croissance musculaire rapide et massive. Cette seconde phase fait intervenir des précurseurs myogéniques différents de ceux impliqués dans la phase précédente.

Les cellules à l'origine de la seconde phase de la myogenèse semblent exprimer à la fois *Pax7* et *Pax3* (ce dernier étant indispensable à la myogenèse). Des expériences menées chez le poulet laissent présager que ces cellules proviennent de la région centrale du dermomyotome (Gros *et al.* 2005) mais très peu de choses sont connues sur ces précurseurs. On sait cependant qu'elles ont une forte activité mitotique et permettent une croissance musculaire par hyperplasie, c'est-à-dire par la formation de nouvelles fibres dites secondaires (les fibres primaires étant celles formées lors de la première phase de la myogenèse), et par hypertrophie, c'est-à-dire par l'augmentation de la taille des fibres existantes grâce à la fusion des cellules progénitrices avec celles-ci.

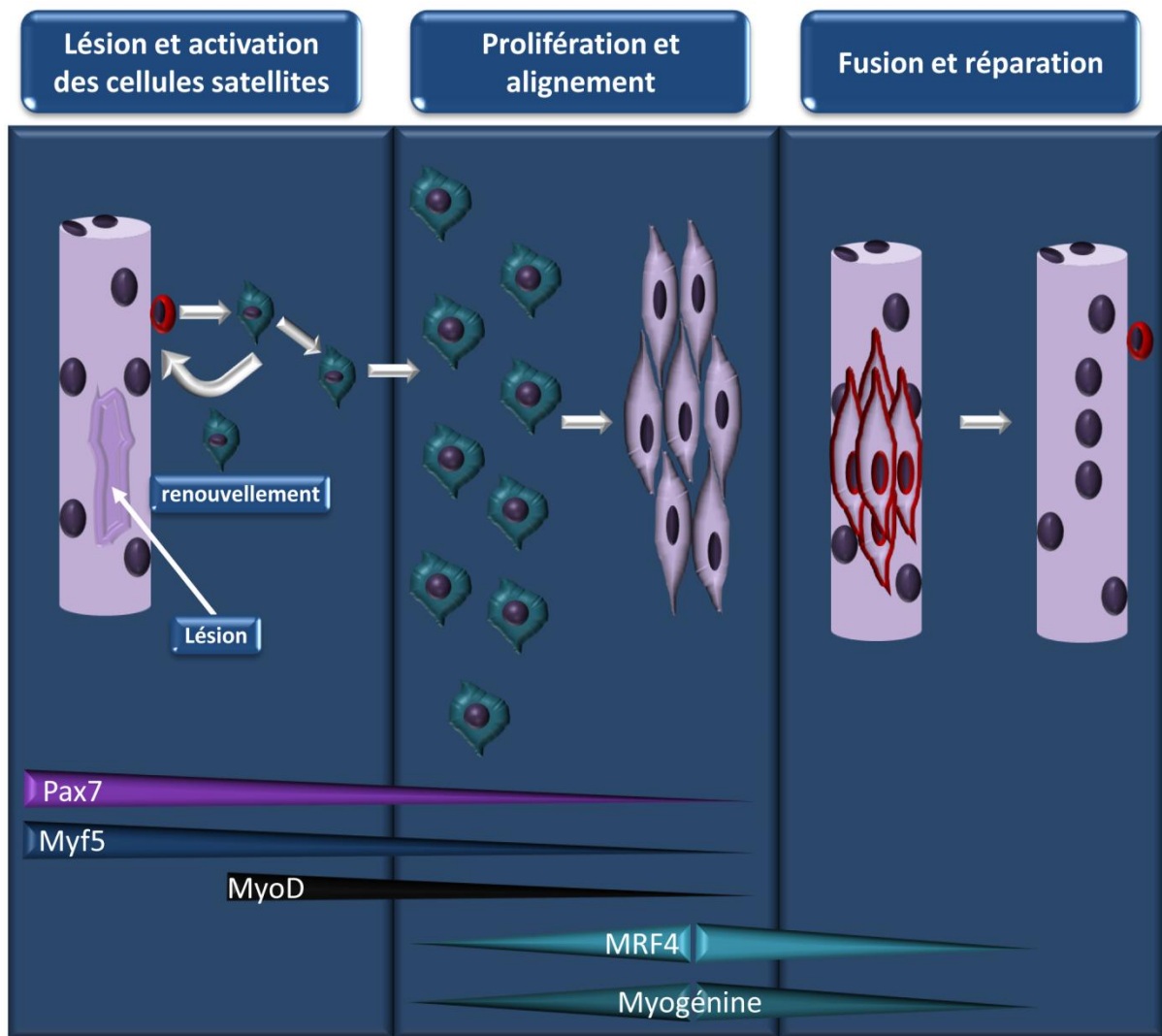


Figure 5 : croissance et réparation du muscle adulte par les cellules satellites (d'après Boldrin, Muntoni et Morgan 2010)

III-Croissance et réparation postnatales des fibres musculaires : Troisième phase de la myogénèse

Lors de la myogénèse, certaines cellules sortent du cycle et ne se différencient pas : on les appelle cellules satellites ou de réserve. Elles permettent la réparation et la croissance musculaires et sont capables de s'auto-renouveler (Figure 5). Cette population cellulaire, identifiée pour la première fois chez *Xenopus laevis* par Mauro en 1961, est caractérisée par l'expression de facteurs spécifiques dont *Pax7*. Il est à noter cependant que la croissance musculaire due aux cellules satellites est uniquement hypertrophique, le nombre total de fibres au sein d'un groupe musculaire étant défini lors des deux premières phases de la myogénèse. Avec l'âge, le nombre de ces cellules diminue, rendant la réparation du muscle

moins efficace et aboutissant à l'affaiblissement de la musculature chez les individus âgés, ce que l'on appelle sarcopénie. L'expression de *Pax7* semble être le facteur le plus important pour les cellules satellites. En effet, les animaux pour lesquels ce gène est inactivé présentent une perte rapide de cette population cellulaire par apoptose après la naissance (Seale *et al.* 2000, Relaix *et al.* 2006). De plus, l'élimination des cellules exprimant *Pax7* empêche la régénération de lésions induites dans des muscles murins (Lepper *et al.* 2011 ; Sambasivan *et al.* 2011). Cependant, d'un point de vue fonctionnel, l'expression de *Pax7*, semble nécessaire uniquement lors de la fusion des cellules satellites avec les fibres musculaires durant la période de croissance néonatale. En effet, l'inactivation de ce gène chez des souris adultes n'empêche pas la régénération du muscle *in vivo* (Lepper *et al.* 2009). Il est donc intéressant de constater que l'intégralité des cellules permettant la régénération musculaire exprime *Pax7* alors que ce dernier ne semble pas avoir de rôle durant ce processus.

Actuellement, il n'y a pas de modèle consensus expliquant l'activation de ces cellules, ni de preuve qu'un facteur particulier serait sécrété par les fibres musculaires endommagées mais de nombreuses pistes sont explorées. Une fois activées, ces cellules prolifèrent de la même manière que les précurseurs myogéniques des deux phases précédentes, puis fusionnent avec les fibres existantes ajoutant ainsi un noyau supplémentaire à la fibre et permettant sa croissance ou sa réparation (Figure 5).

Les cellules satellites participent à la croissance musculaire au début de la vie (21 premiers jours chez la souris, White *et al.* 2010). En revanche, elles ne semblent pas impliquées dans la croissance hypertrophique chez l'adulte et serviraient donc uniquement à la réparation des dommages (Blaauw *et al.* 2009). Les phénomènes d'hypertrophie et d'atrophie du muscle squelettique adulte sont essentiellement dus à la régulation de la synthèse et de la dégradation des protéines musculaires. Ces processus font intervenir une quarantaine de facteurs (Figure 6) qui vont tous agir de manière directe ou indirecte sur trois protéines : AKT, FOXO1 et FOXO3A (forkhead box O1 et O3A, Sandri *et al.* 2004, Stitt *et al.* 2004). Les protéines FOXO sont des facteurs de transcription qui ne peuvent entrer dans le noyau qu'une fois phosphorylés. Elles contrôlent l'expression de gènes impliqués dans l'atrophie musculaire (atrogènes) dont les produits sont responsables de la dégradation de protéines myofibrillaires, métaboliques et de facteurs de transcription par les systèmes ubiquitine/protéasome et lysosomal. Parmi les cibles de FOXO, on trouve l'atrogène 1 (MAFBX1) et MURF (muscle-upregulated RING finger ubiquitin ligase) (Sandri 2008).

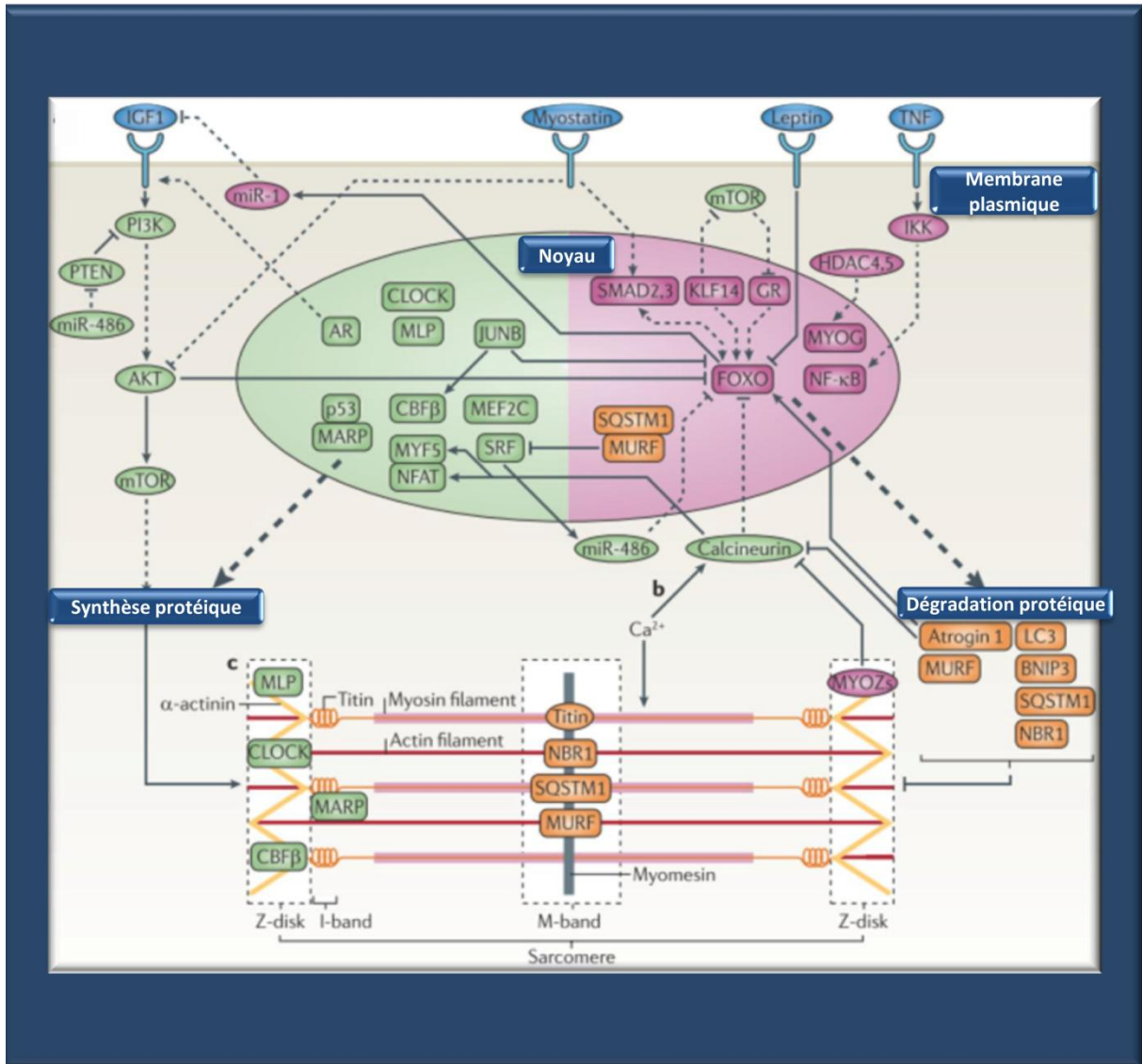


Figure 6 : voie de régulation de la synthèse et de la dégradation protéiques dans le muscle (d'après Braun et Gautel 2011)

AKT, quant à elle, est l'élément central de la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et est capable d'activer la synthèse protéique en activant mTOR (mammalian target of rapamycin) (Sandri 2008). En plus de ce rôle sur la synthèse protéique, AKT peut bloquer les protéines FOXO en les déphosphorylant.

Un grand nombre de voies de signalisation et de facteurs agissent sur AKT et FOXO en contrôlant leur activation. Parmi les différents facteurs anabolisants, on peut citer des protéines dépendant de l'activité musculaire comme la calcineurine qui inhibe FOXO et qui est elle-même activée par les ions calcium (Ca²⁺), à l'origine de la contraction musculaire, des cytokines (TNF : tumor necrosis factor), la leptine dont le taux dépend de la prise alimentaire et IGF1 (insuline like growth factor 1) qui active la voie PI3K-AKT en se liant à son

récepteur. IGF1 remplit plusieurs rôles dans ce processus car certains de ces variants d'épissage sont exprimés en réponse au stress mécanique subi par le muscle (Goldspink 1999, Vinciguerra *et al.* 2010), et un autre en cas d'activation du récepteur aux androgènes. L'effet anabolique des androgènes est donc lié à IGF1 (Chambon *et al.* 2010). En ce qui concerne les facteurs à activité catabolique, les voies les plus importantes sont celles du récepteur aux glucocorticoïdes qui active FOXO et est inhibé par mTOR (Shimizu *et al.* 2011) et la voie des SMAD qui inhibe AKT, active FOXO et qui dépend du récepteur ActRIIB sur lequel se fixe notamment la myostatine et l'activine.

Des microARN sont également impliqués dans la régulation de l'hypertrophie et de l'atrophie musculaire chez l'adulte comme miR-486 et miR-1 (Elia *et al.* 2009, Small *et al.* 2010).

On constate donc que le muscle squelettique est un organe dont la mise en place est très régulée et qui évolue tout au long de la vie en réponse à de nombreux stimuli.

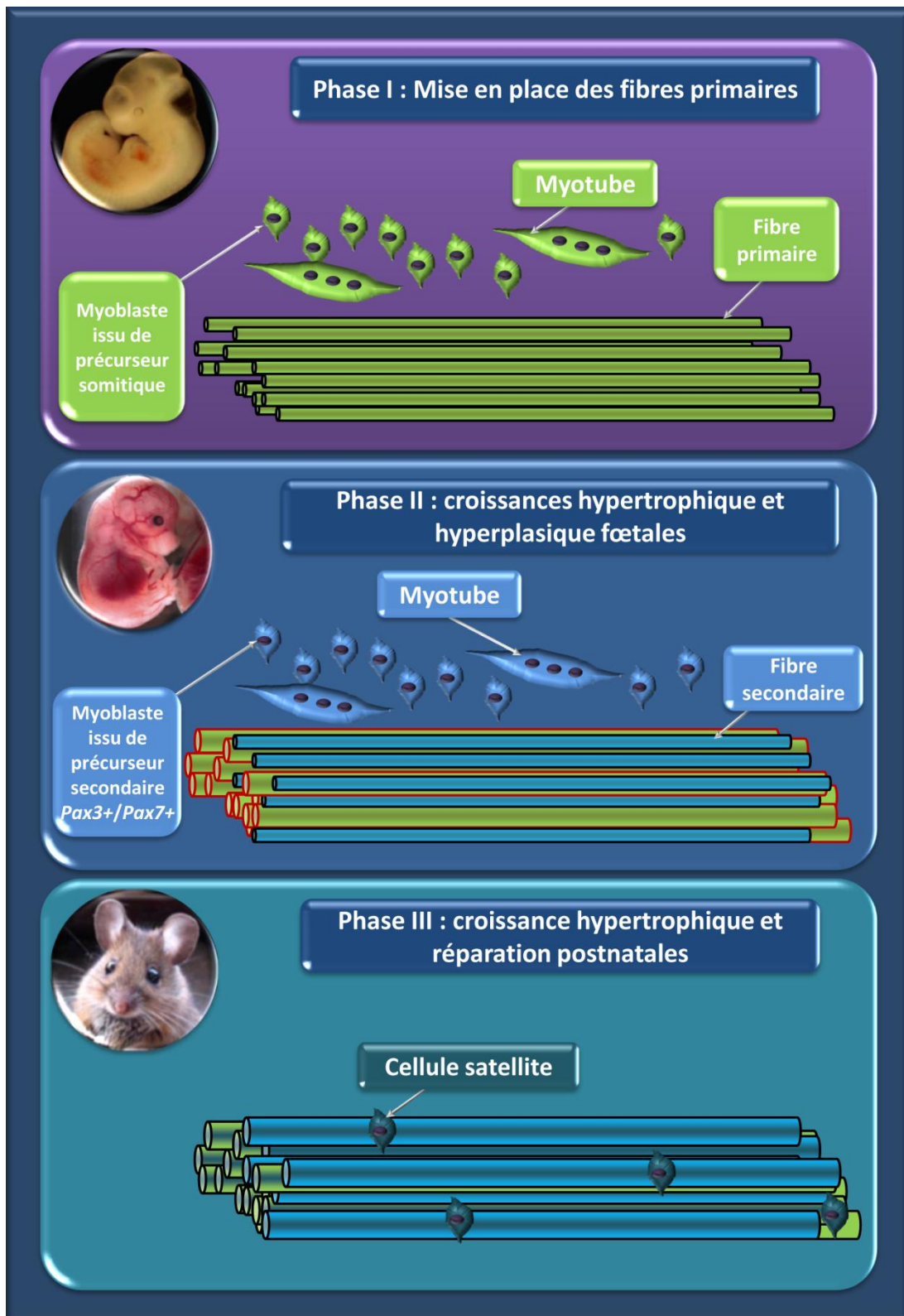


Figure 7 : les trois phases de la myogenèse

Photos :

- Embryon de souris au stade E11, (<http://www.Dreamstime.com/stock-photos-mouse-embryo-day-11-of-development-image744143>).
- Fœtus murin, photo de Nancy Speck, PhD, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania (http://www.uphs.upenn.edu/news/News_Releases/2011/12/speck-stem-cells/).
- Souris adulte (http://www.free-extras.com/images/cute_mouse-8551.htm).

IV-Anatomie et structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est constitué de plusieurs faisceaux, eux-mêmes constitués de 10 à 100 fibres musculaires qui constituent l'élément de base du muscle. Ces fibres sont multinucléées et peuvent mesurer jusqu'à 30 cm de long pour un diamètre variant de 10 à 100 μm (Bouisset *et al.* 1995). Environ 80% du volume d'une fibre est occupé par des myofibrilles qui sont des structures cytosquelettiques très organisées de 1 à 2 μm de diamètre permettant aux fibres musculaires de se contracter (Titora et Grabowski 1994).

Ces sous-ensembles sont délimités par différentes membranes. Ainsi, le muscle est entouré par l'épimysium, les faisceaux par le périmysium et les fibres par l'endomysium. Pour finir, une membrane appelée sarcolemme délimite les myofibrilles (Figure 8). Toutes les myofibrilles d'une même fibre sont parfaitement alignées et parallèles. Elles présentent une succession de bandes sombres dites bandes A (anisotropes) qui correspondent aux chaînes de myosine, et de bandes claires dites bandes I (isotropes) correspondant aux filaments d'actine. Au milieu de chaque bande A se trouve la zone H ou zone de Hensen qui correspond à la zone où les filaments de myosine ne sont pas superposés aux filaments d'actine (Craig et Padron 2004) (Figure 9). Cette zone varie donc en taille en fonction de la contraction/relaxation de la fibre. Au centre de la zone H se trouve la ligne M qui correspond au point d'ancrage des filaments de myosine. Les filaments d'actine, quant à eux, sont fixés à la cellule à des zones appelées stries Z qui sont situées au centre des bandes I. L'espace entre deux stries Z est appelé sarcomère et correspond à une unité fonctionnelle de la myofibrille. Ces structures sont donc constituées de multiples sarcomères reliés entre eux par ces stries Z (Craig et Padron 2004). Les sarcomères sont consolidés par des protéines de structure comme la desmine qui attache, au niveau des lignes M et des stries Z, les diverses myofibrilles entre-elles ou la titine qui lie les chaînes de myosine aux stries Z.

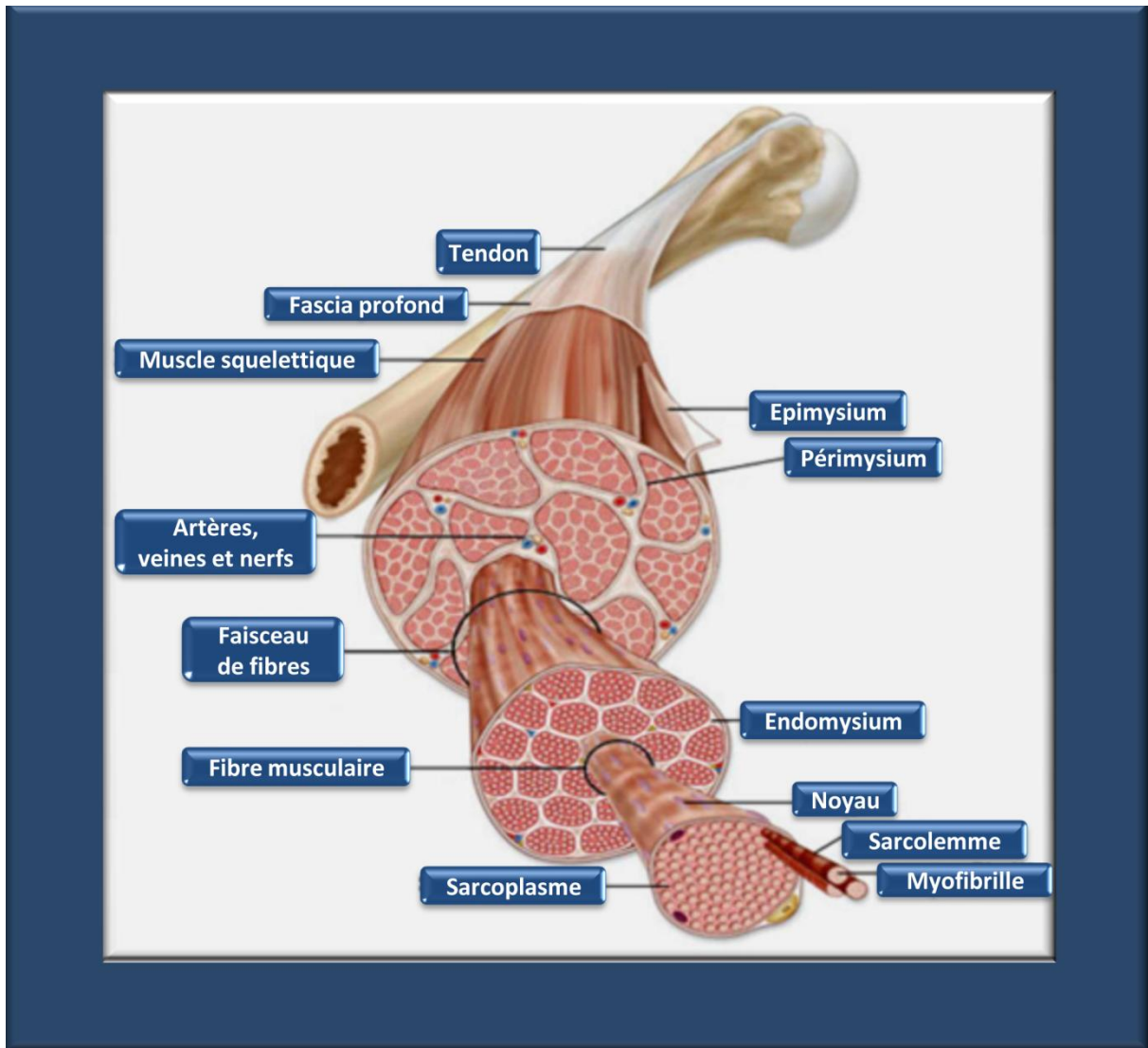


Figure 8 : anatomie du muscle squelettique (modifiée d’après une figure des éditions McGraw-Hill)

Par-dessus les myofibrilles et tout au long de la fibre se trouvent de petits canaux appelés reticulum sarcoplasmique tandis qu’au niveau des jonctions entre chaque bande A et I se trouvent des invaginations du sarcolemme appelées tubules transverses et qui sont en contact avec le reticulum et les citernes terminales (Figure 10). Le but de cette structure appelée triade est de contenir le calcium qui sera libéré dans le sarcoplasme pendant la contraction (Craig et Padron 2004).

Les muscles sont attachés à d’autres muscles, aux tendons et aux os via les tissus conjonctifs, eux-mêmes constitués de fibres de collagène provenant notamment des membranes musculaires (endomysium, pérимysium et épимysium).

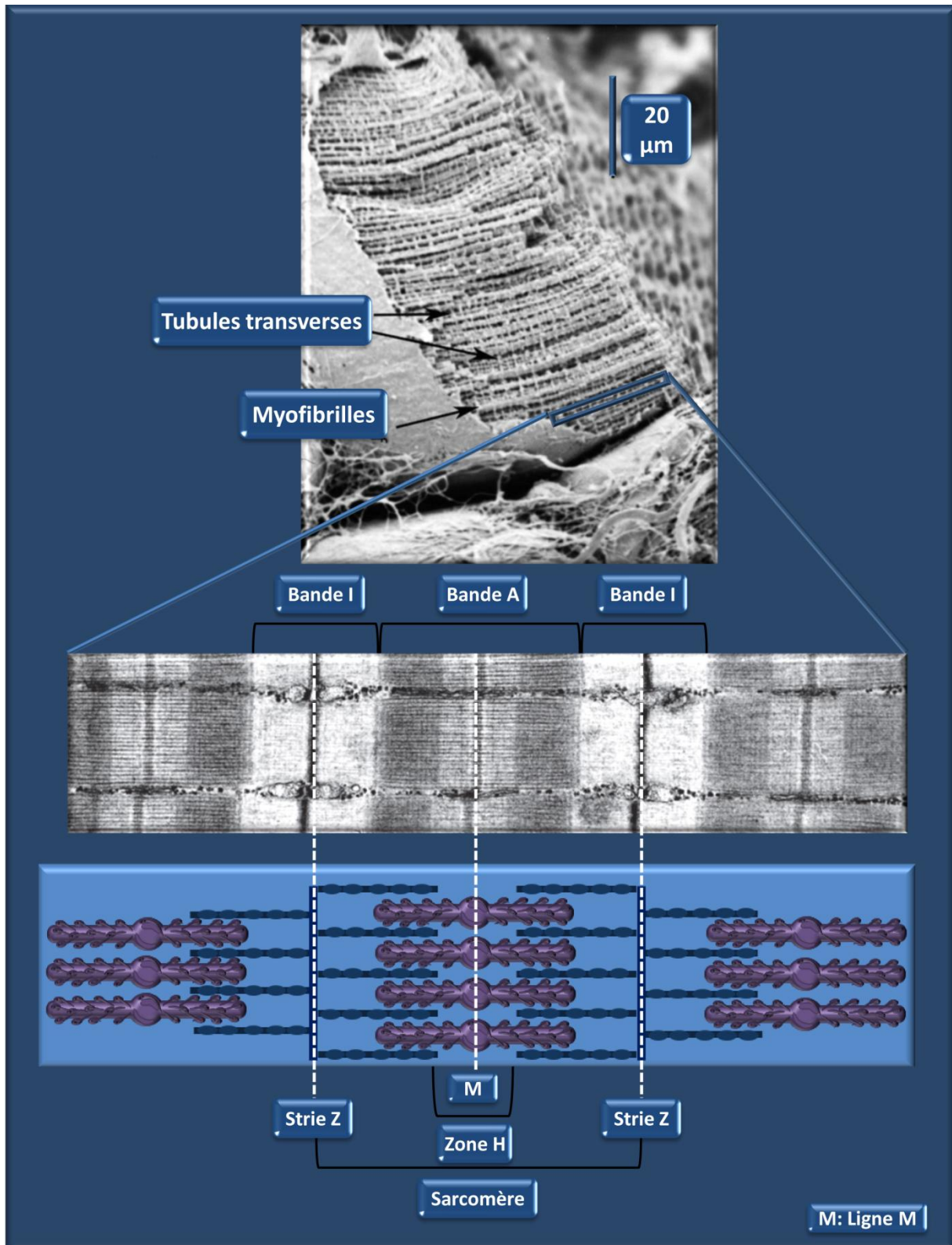


Figure 9 : structure du muscle squelettique

Figure réalisée en utilisant des éléments de Servier Medical Art.

Photos:

- Smith College, Northampton, Massachusetts, department of biological sciences (<http://131.229.88.77/microscopy/Portfolios/Portfolios08/Yi/Page312.htm>).
- Physics, Computer Science, and Biophysics at UIUC (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/telethonin/>).

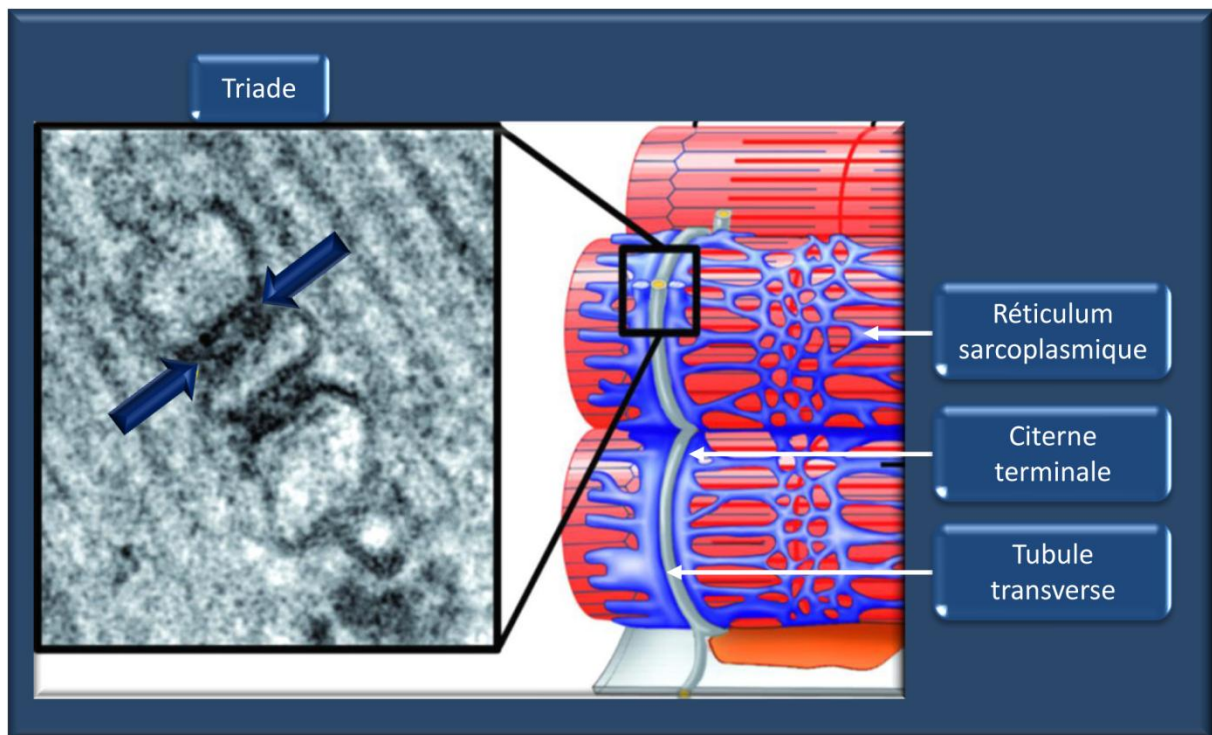


Figure 10 : structure d'une triade : tubule T, réticulum sarcoplasmique, citerne terminale
(d'après Al-Qusairi et Laporte 2011)

V-Les différents types de fibres musculaires

Les fibres musculaires ne sont pas toutes identiques. On peut en effet les classer en plusieurs catégories en fonction de deux paramètres : la vitesse de contraction et le métabolisme qu'elles utilisent préférentiellement pour fournir l'énergie nécessaire à cette contraction. Un muscle est donc constitué d'un mélange de différentes fibres, la proportion de chacune d'elles déterminant la vitesse et le métabolisme global de celui-ci. Historiquement, on a commencé par distinguer les fibres dites « blanches » à contraction rapide et faisant appel au métabolisme anaérobie (glycolitique), et les fibres « rouges », aérobies (ou oxydatives) et à contraction lente : la différence de couleur provenant de la quantité de myoglobine, équivalent musculaire de l'hémoglobine, présente en grande quantité dans les fibres « rouges » afin de transporter l'oxygène nécessaire à leur fonctionnement. En 1961, Engel met au point une coloration de l'ATPase myofibrillaire après incubation à un pH de 10,4. Il distingue alors des fibres à contraction lente, dites de type I et de couleur claire, et des fibres à contraction rapide apparaissant foncées qu'il appelle fibres de type II. Par la suite, des incubations à un pH différent (4,6, Figure 11) ont permis de distinguer des fibres de type IIa rapides avec un métabolisme mixte aérobie/anaérobie et des fibres IIb rapides anaérobies (Brooke et Kaiser 1970).

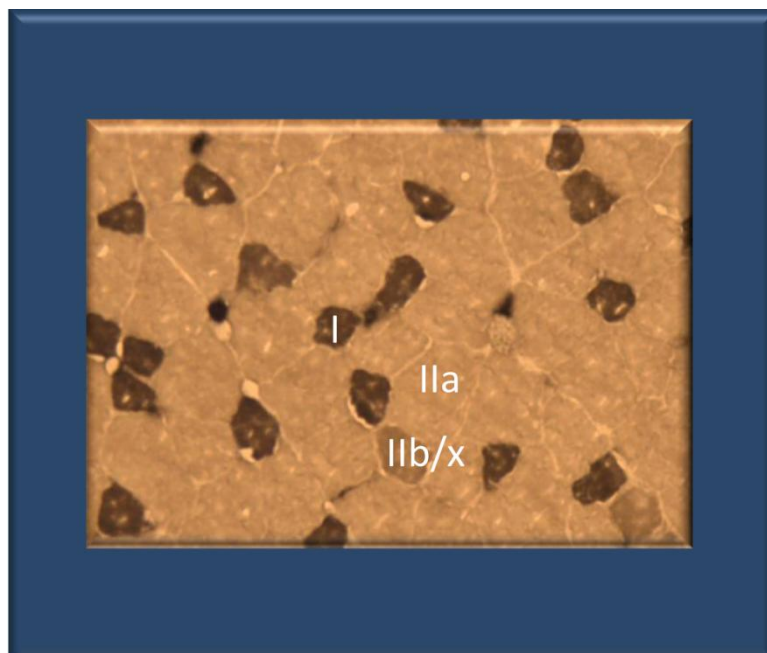


Figure 11 : coloration ATPase pH 4,6

La vitesse de contraction comme l'activité ATPase myofibrillaire et le métabolisme préférentiellement utilisé par la fibre dépendent en partie des chaînes lourdes de myosine (MyHC). On peut également classer les fibres en fonction de la MyHC qu'elles expriment (Schiaffino and Reggiani, 1996). De nombreuses isoformes ont été décrites (Tableau 1). Certaines isoformes sont spécifiques de certains muscles (myosine extraoculaire ou EOM, laryngal IIL, myosine des muscles masticateurs IIM (non exprimée chez l'homme) ou slow tonic (Wieczorek *et al.* 1985, Perie *et al.* 2000) et d'autres de certains stades de développement comme la myosine néonatale et la myosine embryonnaire (Staron et Johnson 1993) (table 1). La myosine IA, quant à elle, ne semble exprimée que dans les fibres en transition d'un phénotype à contraction rapide vers un phénotype à contraction lente (Fauteck et kandarian, 1995). Les MyHC majoritaires chez l'adulte sont les isoformes I, IIa et IIb auxquelles on peut toutefois ajouter les MyHC IIx (parfois appelées IId) à contraction rapide et à métabolisme anaérobie qui jouent le même rôle que les fibres IIb (chez l'homme, la myosine IIb n'est pas exprimée, les fibres rapides sont donc des fibres IIx, Harrison *et al.* 2011). La plupart des fibres musculaires chez l'adulte n'exprime qu'un seul type de MyHC. En effet, des études chez les rongeurs ont montré que seulement 3% de fibres hybrides expriment à la fois la myosine IIa et IIx (Biral *et al.* 1988, Staron 1991, Galler *et al.* 1994 Staron *et al.* 1999) et 10% expriment à la fois la myosine IIb et IIx (ces dernières ayant des promoteurs similaires) (Staron et Pette 1993, Harrison *et al.* 2011).

Tableau 1 : principales isoformes de myosines exprimées dans le muscle squelettique chez l'homme

Gène	Localisation chromosomique	Remarque
<i>MYO1A</i>	12q	
<i>MYO1C</i>	17p	Myosine I β ou I
<i>MYH1</i>	17p	Myosine IIx ou IId
<i>MYH2</i>	17p	Myosine IIa
<i>MYH3</i>	17p	Myosine II embryonnaire
<i>MYH4</i>	17p	Myosine IIb
<i>MYH6</i>	14q	Myosine cardiaque II α
<i>MYH7</i>	14q	Myosine cardiaque II β
<i>MYH8</i>	17p	Myosine II périnatale
<i>MYH9</i>	22q	Myosine non musculaire IIa
<i>MYH10</i>	17p	Myosine non musculaire IIb
<i>MYH11</i>	16p	Myosine II périnatale
<i>MYH13</i>	17p	Myosine II extraoculaire (EOM) et Laryngal (IIL) par épissage alternatif
<i>MYH 2M</i>	7	Pseudogène chez l'homme

Les types de fibres principaux ont chacun des caractéristiques importantes :

- Fibres de type I : elles sont essentiellement à métabolisme oxydatif. Ces fibres possèdent donc un grand nombre de mitochondries, sont très irriguées et riches en myoglobine. Leur réticulum sarcoplasmique est de petite taille et elles possèdent peu de myofibrilles donc génèrent peu de force. Le fait qu'elles fassent appel préférentiellement au métabolisme aérobie les rend peu fatigables.
- Fibres de type IIa : ce sont des fibres intermédiaires, moins rapides que les IIb/x, moyennement fortes et faisant appel aux deux types de métabolisme.
- Fibres de type IIb et IIx : il s'agit de fibres à contraction très rapide, utilisant préférentiellement le métabolisme glycolytique, ce qui les rend très fatigables. Elles possèdent un grand nombre de myofibrilles et un réticulum sarcoplasmique très développé, ce qui leur permet de générer une grande force.

La proportion de fibres musculaires de chaque type dans le muscle n'est pas figée. En effet, le muscle squelettique est un organe doté d'une grande plasticité et il s'adapte à l'effort qui lui est demandé. Prenons l'exemple d'un athlète s'entraînant au sprint, il va solliciter certains groupes musculaires de manière explosive avec des contractions rapides et courtes ne sollicitant pas le système aérobie. Les muscles mis en jeu vont donc s'adapter et on va observer une augmentation du nombre de fibres de type IIx provenant de la transformation ou « switch » des fibres IIa (Pette et Staron 2000). De la même manière, une personne sollicitant ses muscles sur des contractions de faible puissance durant des périodes longues verra un enrichissement des muscles mis en jeu en fibres de type I. Il est admis que de 3 à 13% des fibres de chaque muscle sont en cours de switch (Staron *et al.* 1999), et expriment donc plusieurs isoformes de myosine.

La détermination du type de fibres dépend donc en grande partie de la myosine exprimée dans la cellule. De nombreux facteurs hormonaux, neuromusculaires ou mécaniques peuvent influencer l'expression des myosines. Lors du développement embryonnaire, les fibres ne sont pas innervées, elles expriment la MyHC embryonnaire. Par la suite, lors de la période néonatale, l'expression de cette myosine embryonnaire perdure et la myosine néonatale est également présente dans le muscle. Les muscles squelettiques commencent à avoir une réelle fonction et à s'adapter à l'environnement : les chaînes lourdes de myosine adulte (I, IIa, IIb, IIx) commencent à être exprimées 5 jours après la naissance chez la souris,

les souris d'environ deux semaines n'expriment plus les myosines embryonnaires et, une semaine plus tard, les myosines néonatales ne sont plus détectées dans le muscle (Agbulut *et al.* 2003). Cette capacité d'adaptation du tissu musculaire semble dépendre de voies de signalisation faisant appel à la calcineurine, une phosphatase à sérine/thréonine, calcium-dépendante, sensible à la cyclosporine dont l'activation entraîne la détermination d'une fibre en fibre lente et, inversement, son inactivation, une transformation en fibre rapide (Chin *et al.* 1998). Des protéines de la famille NFAT (calcineurin-nuclear factor of activated T cells) et MEF2 (Chin *et al.* 1998) seraient impliquées dans la transcription de gènes spécifiquement exprimés dans les fibres lentes, tandis que MEF2, MYOD (Hughes *et al.* 1997) et SRF (serum response factor, Harrison *et al.* 2011) semblent impliqués dans la détermination des fibres de type II. L'activation ou l'inactivation de la calcineurine est due à la présence d'ions Ca^{2+} et dépend donc de l'activité du motoneurone innervant la fibre musculaire. De plus, il a été montré récemment (Chakkalakal *et al.* 2010) que la présence de SV2A (synaptic vesicle protein 2A) dans les terminaisons axonales induit la formation de fibres de type I, SV2A étant exprimée à la naissance puis inhibée dans les fibres de type IIb/x. Ceci démontre que le type de fibres présent dans un muscle est directement lié à son innervation et peut varier en fonction des signaux envoyés par les nerfs moteurs.

VI-Les pathologies du muscle squelettique et les phénotypes d'hypermusculature

La quasi-totalité des pathologies concernant les muscles squelettiques entraîne une diminution de la masse et de la fonction de ces derniers. La perte de masse musculaire est divisée en différentes catégories : les dystrophies musculaires qui sont des maladies génétiques, et les syndromes de perte de masse musculaire que sont les cachexies et la sarcopénie où le génotype musculaire des patients est normal.

VI-1-Les maladies neuromusculaires

Le terme général « maladie neuromusculaire » désigne une maladie génétique qui touche directement un constituant du système nerveux ou des muscles. On distingue un grand nombre de ces maladies (liste en annexe 1) que l'on peut différencier par leur mode de transmission, l'origine de la mutation génétique, l'incidence, les symptômes, l'âge de la

survenue, le rythme de progression et le pronostic. On peut ainsi les classer en plusieurs groupes :

- les ataxies d'origine génétique qui sont un manque de coordination des mouvements volontaires généralement dû à une atteinte des neurones du système nerveux central,
- les maladies affectant les neurones moteurs,
- les maladies des nerfs périphériques,
- les maladies affectant la jonction neuromusculaire,
- les maladies affectant directement le muscle squelettique.

Dans ce dernier groupe, on trouve les dystrophies musculaires (dégénérescences progressives du muscle) ainsi que les myopathies avec anomalies structurelles, les myopathies inflammatoires, les maladies myotoniques, les maladies des canaux ioniques et les maladies musculaires métaboliques. Les principales maladies incluses dans ce groupe sont brièvement décrites dans le tableau 2.

Tableau 2 : liste des principales maladies génétiques affectant les muscles squelettiques (d'après le site internet Dystrophie musculaire Canada, <http://www.muscle.ca>)

Nom de la maladie	Abréviation	Transmission	Description
Dystrophie des ceintures	DMC	Dominante pour les types 1 et récessive pour les types 2	Englobe un groupe de maladies neuromusculaires qui affectent essentiellement les muscles volontaires situés autour des épaules et de la région pelvienne (les hanches).
Dystrophie facio-scapulo-humérale	FSH	Dominante	Troisième dystrophie la plus fréquente après la DMD et les dystrophies myotoniques. Elle est causée par une délétion de la région régulatrice.
Dystrophie musculaire congénitale	DMC	Dominante ou récessive	Dystrophie musculaire dont les symptômes apparaissent dès la naissance.
Dystrophie musculaire de Becker	DMB	Liée au chromosome X	Maladie touchant le gène de la dystrophine. Variante moins grave et moins évolutive que la dystrophie musculaire de Duchenne.
Dystrophie musculaire de Duchenne	DMD	Liée au chromosome X	Maladie touchant le gène de la dystrophine. Les premiers symptômes apparaissent vers l'âge de 5 ans.

Dystrophie musculaire oculopharyngée	DMOP	Dominante ou récessive	Forme de dystrophie musculaire qui affecte la déglutition (capacité d'avaler) et les muscles qui entourent l'œil. Elle est causée par une atteinte du gène <i>Pabn1</i> .
Dystrophie myotonique (aussi appelée maladie de Steinert)	-	Dominante	Caractérisée par un affaiblissement, une atrophie musculaire progressive et par une myotonie. C'est une maladie multisystémique touchant un vaste éventail de tissus en plus des muscles.
Myopathies mitochondriales	-	Sporadique	Groupe de maladies qui affecte les mitochondries comme le syndrome de Kearns-Sayre (KSS) ou le syndrome de Leigh.
Maladie de McArdle	-	Récessive	Provoque des douleurs et des crampes musculaires graves. Elle est causée par une incapacité à produire la myophosphorylase, qui est nécessaire à la dégradation du glycogène.
Maladie de Pompe (aussi appelée déficience en maltase acide et glycogénose de type II)	-	Récessive	Maladie causée par une atteinte du gène de la α -1,4-glucosidase acide.
Maladies dysimmunitaires (myosites) : polymyosite, myosite à corps d'inclusion et dermatomyosite	-	Sporadique	Ce sont des maladies caractérisées par l'inflammation des muscles squelettiques. Elles entraînent la faiblesse musculaire et, dans certains cas, une incapacité grave.
Myopathie à némaline	-	Dominante pour les types 1 et récessive pour les types 2	Groupe de maladies génétiques rares qui affectent le tonus et la force des muscles. On l'appelle aussi myopathie à bâtonnets parce que, sous microscope, on observe des bâtonnets de forme anormale (les némalines).
Myopathie multicore	MM	Récessive ou sporadique	Les personnes atteintes éprouvent une faiblesse généralisée et une atrophie musculaire. 50% des cas sont causés par un défaut dans les gènes de la sélénoprotéine 1 (SEPN1) ou du récepteur de ryanodine 1 (RYR1).
Myotonie congénitale (maladie de Thomsen, myotonie généralisée de Becker, paramyotonie congénitale, syndrome de Schwartz-Jampel)	-	Dominante ou récessive	La myotonie n'est pas définie comme une maladie, mais comme le symptôme d'anomalies musculaires diverses caractérisées par une lenteur anormale de la décontraction des muscles.

Les pathologies musculaires ne sont pas forcément dues à des atteintes génétiques ou auto-immunitaires. En effet, un dérèglement de l'homéostasie dû à une autre pathologie peut entraîner de graves problèmes au niveau du muscle. On appelle ces désordres les cachexies.

VI-2-Les cachexies

La cachexie correspond à une perte de poids et notamment de muscle dont la cause est une pathologie chronique sous-jacente. On en distingue différents types (Glass et Roubenoff 2010) :

- cachexie liée au cancer,
- cachexie cardiaque,
- cachexie liée au SIDA,
- cachexie liée à la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO),
- cachexie rhumatoïde.

Les causes de ces cachexies peuvent varier, mais elles sont généralement dues à une malnutrition, des changements importants dans le métabolisme, la diminution de la production hépatique d'IGF1, de l'hormone de croissance (GH) ou la diminution de la production de testostérone chez les patients de sexe masculin causée par les diverses pathologies chroniques du patient.

VI-3-La malnutrition

Il s'agit ici d'un manque protéino-calorique entraînant une diminution de la masse corporelle. On en distingue deux types (Golden 2010) :

- le marasme alimentaire, qui touche les enfants de moins d'un an et peut être dû à diverses causes comme notamment des infections gastro-intestinales,
- le Kwashiorkor qui touche les enfants âgés de 18 à 36 mois. Il est généralement dû à une diminution drastique des apports protéiques et caloriques lors d'un sevrage brutal de l'enfant, souvent provoqué par l'allaitement d'un autre enfant par la mère.

VI-4-La sarcopénie

La sarcopénie (du latin *sarcopenia* qui signifie diminution de la chair) n'est pas une pathologie. Il n'existe pas de définition précise de la sarcopénie. Pour certains, il s'agit d'une diminution de la masse musculaire de plus de deux écart-types par rapport à la masse moyenne observée chez de jeunes adultes en bonne santé (Baumgartner *et al.* 1998). Pour d'autres, il s'agit non seulement d'une diminution de la masse musculaire, mais également de la fonction musculaire : force et puissance (Abellan van Kan *et al.* 2009). La sarcopénie se caractérise par la perte de 30 à 50% de la masse musculaire en fonction de l'âge (Iannuzzi *et al.* 2002, Doherty 2003, Cruz Jentoft *et al.* 2010) et d'une diminution de la force. Un muscle atteint généralement sa force maximale chez les individus d'environ 30 ans, âge auquel le diamètre des fibres est maximal (Lexel *et al.* 1988). Cette force diminue ensuite progressivement. On estime qu'une personne de 65 ans a déjà perdu un tiers de sa force musculaire, la diminution de ce paramètre devenant de plus en plus rapide avec l'âge (Evans *et al.* 1997).

La sarcopénie est provoquée par différents facteurs présentés dans le tableau 3 mais le plus important reste la diminution du nombre de motoneurones α qui va entraîner une dénervation des fibres musculaires. Cette dénervation touche en particulier les fibres de type II (probablement parce que les muscles rapides sont moins sollicités que les muscles lents) (Lexel *et al.* 1997) et peut entraîner non seulement une atrophie des fibres mais également une diminution de leurs nombres (Lexel *et al.* 1988, 1999, 1995, Bemben 1999). Cette diminution implique une baisse de réactivité, ce qui peut expliquer le fait que les personnes âgées chutent plus fréquemment.

La pratique d'exercices de résistance musculaire permettrait de nuancer les symptômes de la sarcopénie (Bemben *et al.* 1999) probablement en stimulant les motoneurones α innervant les fibres à contraction rapide, évitant ainsi leur dégradation. Cependant, d'autres facteurs entrent en jeu (tableau 3), et la diminution du poids et de la fonction musculaire avec l'âge semblent difficile à enrayer.

Tableau 3 : facteurs neurologiques et musculaires impliqués dans l'apparition de la sarcopénie
(d'après Kenneth S. O'Rourke 2011)

Facteurs neurologiques
• <i>Cellulaires et structuraux</i>
◦ Diminution du nombre et de la taille des motoneurones α spinaux
◦ Diminution du nombre de terminaisons nerveuses et fragmentation de la jonction neuromusculaire
◦ Diminution du nombre de récepteurs à l'acétylcholine
◦ Détérioration de la myéline et atrophie axonale
◦ Perte de connexions synaptiques des motoneurones avec le système nerveux central
• <i>Métaboliques</i>
◦ Conduction axonale altérée
◦ Diminution de la sécrétion de neurotransmetteurs
◦ Diminution de l'activité électrique des unités motrices
◦ Diminution de la production locale d'IGF1, CNTF (ciliary neutropic factor) et d'autres neurotrophines
◦ Altération du découplage excitation-contraction
Facteurs musculaires
• <i>Cellulaires et structuraux</i>
◦ Changement de la vascularisation du muscle dû à l'âge
◦ Accumulation de blessures induites par la contraction
◦ Diminution du nombre de cellules satellites
◦ Altération des mitochondries (accumulation de mutations dans l'ADNmt, diminution du nombre de copies de l'ADNmt, diminution de la concentration en ARNm des gènes codant les protéines mitochondriales, diminution de l'activité des enzymes oxydative et diminution de la synthèse protéique)
• <i>Métaboliques</i>
◦ Diminution des stimuli anabolisants (oestrogène, testostérone, DHEA, GH, IGF1, IGF binding protein-3, IGF1 spécifique du muscle)
◦ Diminution du taux de vitamine D et de son récepteur
◦ Diminution de la transcription de DHPR α 1S
◦ Diminution de l'activation des voies Notch et MAPK/pERK impliquées dans l'activation des cellules satellites
◦ Augmentation de l'apoptose
◦ Augmentation des stimuli cataboliques (IL6/TNF α /IL1)
◦ Augmentation de la quantité de myostatine
◦ Augmentation de la protéolyse musculaire
◦ Résistance à l'insuline
◦ Moins bonne réparation des dommages oxydatifs sur l'ADN

VI-5-Les phénotypes d'hypermusculature chez les animaux d'élevage

VI-5-a-Le phénotype Double Musculature (DM) chez le bovin

Depuis plusieurs siècles, les animaux d'élevage sont sélectionnés pour des caractères avantageux comme par exemple la quantité et la qualité de la viande produite par l'animal. En 1807, Culley, éleveur anglais, décrit pour la première fois un caractère d'hypermusculature chez le bovin que l'on appelle double musculature (DM) (Figure 12). Ce phénotype est ensuite décrit plus en détail par Kaiser en 1888. Pendant les cent années qui ont suivies, plusieurs hypothèses ont cohabité pour expliquer le phénotype DM. Certains pensaient qu'il était monofactoriel (Wriedt 1929) d'autres, au contraire, qu'il était multifactoriel (Kronacher 1934, Quesada et Cachafeiro 1971). En 1985, le gène responsable de ce phénotype est nommé *mh* (muscle hypertrophy) (Hanset et Michaux 1985). Il est par la suite localisé au niveau de l'extrémité centromérique du chromosome 2 bovin (Charlier *et al.* 1995). La plus grande avancée dans la compréhension de ce phénotype DM va être due au développement et à la caractérisation d'un modèle murin. En effet, McPherron (1997) met en évidence un nouveau membre de la superfamille des TGF β , la myostatine, qui semble être un excellent candidat pour expliquer les phénotypes DM car son inactivation chez la souris entraîne une augmentation importante de la masse musculaire. Peu de temps après cette découverte, Grobet *et al.* localisent la myostatine bovine au sein du locus *mh* (Grobet *et al.* 1997), l'implication de cette dernière dans la double musculature chez le bovin étant confirmée par Lee et McPherron la même année (McPherron et Lee 1997). La majorité des bovins hypermusclés présente une mutation inactivant la myostatine bien que certaines races présentent ce phénotype alors que ce gène semble intact.

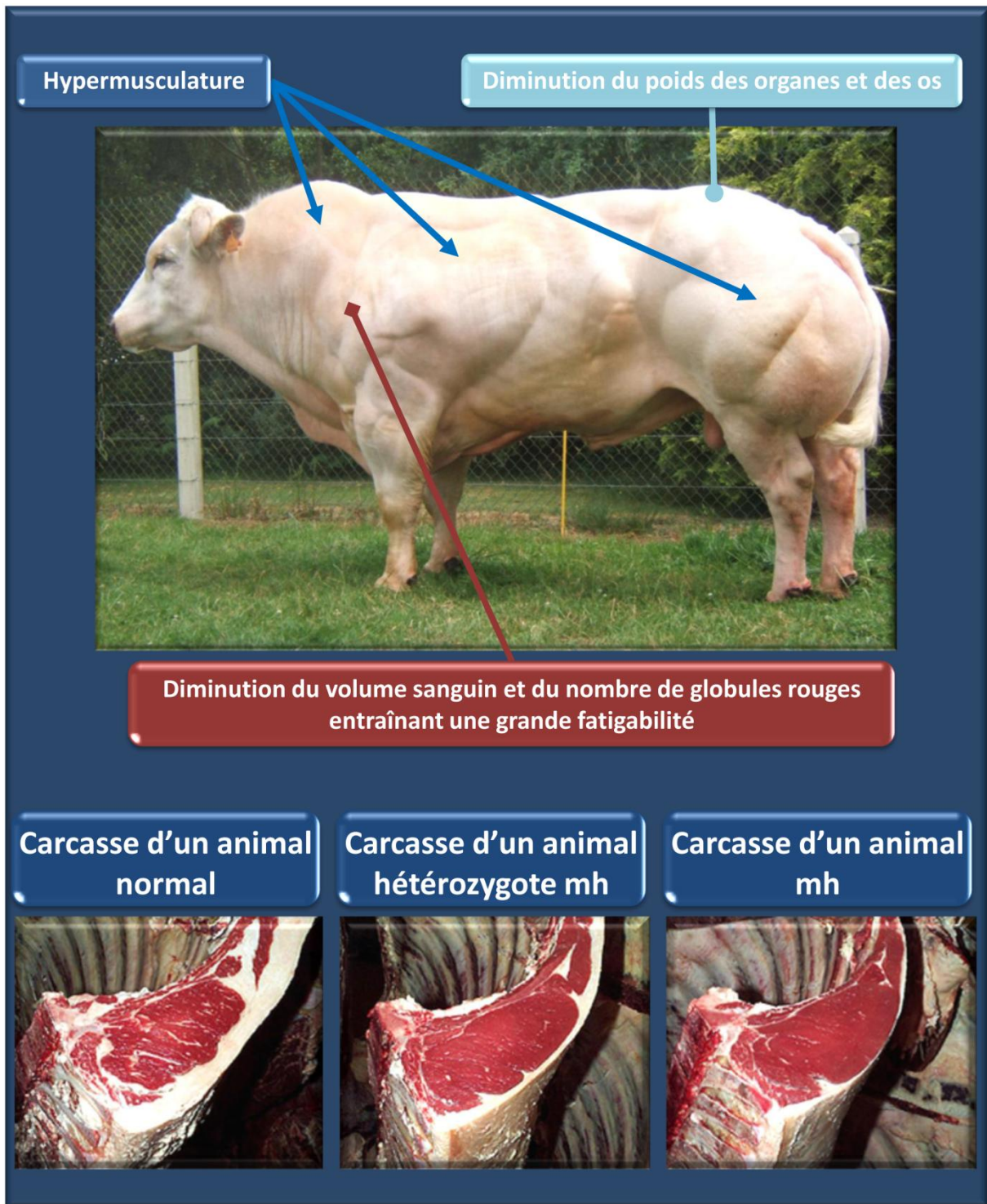


Figure 12 : description du phénotype culard chez le bovin

Photos :

- Ourasi, Taureau BLANC BLEU BELGE Numéro : FR 5604 349600. 1290 kg -1,50m au garrot, Centre d'Insémination Artificielle LA CRESPELLE. (<http://www.cia-crespelle.com>)
- Photos de carcasses du USDA (United states department of agriculture) : (<http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/jul04/beef0704.htm>)

Aujourd'hui, de nombreuses races présentent ce phénotype qui a plusieurs dénominations selon les auteurs : « culard », « cul de poulain », « agropia dopia », « bottle-thighed », « doppellender », « Yorkshire », « greyhound belly », « Teeswater » ou encore « double rumped ». La race Blanc Bleu Belge est la race bovine la plus connue et la plus étudiée pour ces phénotypes d'hypermusculature. Cette race est issue d'un croisement réalisé en Belgique autour de 1850 entre des shorthorns anglaises et des friesians hollandaises (Friend 1978). Ces animaux ont subi une double sélection à la fois pour la production de viande et pour la production de lait. Dans les années 40, la race est séparée en deux rameaux spécialisés : un pour la viande où la totalité des animaux présentent le phénotype DM et le second pour la production de lait. Ces animaux présentent une augmentation de 25% de la masse musculaire (Ménissier 1982a) due essentiellement à une hyperplasie causée par une plus grande prolifération des myoblastes lors de la seconde phase de la myogenèse (Gagnière *et al.* 1997). Ces animaux présentent également une hypertrophie musculaire (Swatland et Kieffer 1974) associée à une diminution de la taille des autres tissus et organes d'environ 40% (notamment le tissu adipeux) ainsi qu'une diminution de la taille de la carcasse (Clinquart *et al.* 1998). Les muscles de ces animaux sont plus glycolytiques que ceux des bovins « normaux » (West 1974, Gagnière *et al.* 1997), ce qui a pour conséquence de donner une viande plus pâle et plus tendre (Ménissier 1982b), la tendreté étant également accentuée par le fait que les muscles de ces animaux présentent moins de tissus connectifs que les animaux dit normaux (Hanset 1991). De plus, la masse grasse et le dépôt de gras intramusculaire (persillage) étant faible, la viande issue des carcasses de ces bovins présente une moindre saveur (Bailey *et al.* 1982, Hanset 1991). Ceci serait dû à une diminution de la taille des adipocytes sous-cutanés et des tissus graisseux, la taille des adipocytes intramusculaires ne semblant pas différente de celle observée chez les animaux normaux (Hocquette *et al.* 1999). Une étude plus précise de la masse grasse a été réalisée sur des bovins hypermusclés Blanc Bleu Belges montrant que la quantité d'acides gras polyinsaturés est inférieure chez ces animaux par rapport à d'autres races ne présentant pas de phénotype DM bien que leur proportion soit sensiblement supérieure (11% des acides gras alors que les animaux normaux ont un taux de 2,7% à 6,1% ; Webb *et al.* 1998). En complément, le même résultat est observé par Smet en 2000 sur les acides gras polaires et l'acide linoléique. Ces animaux ont donc un meilleur rendement de carcasse car ils possèdent moins de masse grasse. La diminution des propriétés organoleptiques de la viande est contrebalancée par un effet bénéfique sur la santé du consommateur.

Les animaux culards ont un taux supérieur de créatinine plasmatique et des taux de créatine (Hanset et Michaud 1982) et d'insuline plasmatiques (Arthur *et al.* 1990) inférieurs à ceux rencontrés chez les animaux normalement musclés. Les résultats concernant le taux d'hormone de croissance (GH) sont, quant à eux, contradictoires, une étude de Michaux *et al.* de 1982 montrant une augmentation alors que Hocquette *et al.* (1999) constatent une diminution de cette hormone dans le plasma de ces animaux.

Les animaux DM présentent une plus grande fatigabilité à l'effort (Holmes *et al.* 1973) due à l'augmentation du nombre de fibres de type II (glycolytiques donc qui produisent du lactate pendant la contraction) et au fait que le volume sanguin de ces animaux soit plus faible que la normale, ce qui ne permet pas d'évacuer efficacement l'acide lactique produit par le muscle. Cette diminution du volume sanguin associée à la diminution du nombre de globules rouges observée chez les animaux culards entraîne une diminution de l'apport d'oxygène au muscle et donc une diminution de l'activité oxydative de ces derniers (Menissier 1982). De plus, l'augmentation de la masse musculaire et l'enrichissement des muscles en fibres de type II entraînent une forte production de chaleur, ce qui ne permet pas aux animaux de tolérer de hautes températures, ceci étant accentué par la diminution de la taille de leurs poumons, diminuant encore leur capacité à dissiper la chaleur.

Pour conclure, la plupart des races européennes destinées à produire de la viande possède des animaux culards. L'intérêt commercial de tels animaux est élevé car le rendement à l'abattage (poids de l'animal/poids de la carcasse froide) est important, de l'ordre de 70% contre 53% pour un animal «normal» (Salers). Ceci est dû au fait que ces animaux possèdent moins de masse grasse et ont des organes autres que le muscle squelettique et des os plus légers. La définition des différents muscles, donc la conformation de la carcasse (annexe 2) est également meilleure (carcasses de classe S ou E). La rentabilité est donc importante pour l'éleveur : une carcasse de vache classée E3 par exemple, se revendant 0,93 euro plus chère au kilo qu'une carcasse U3, constitue un gain de plus de 450 euros par animal (cotation communauté européenne du 13/11/2011). Ces animaux sont donc très rentables pour les éleveurs. Toutefois, les culards présentent des problèmes de fertilité et un grand nombre de femelles ne porte pas leur petit à terme (Strath *et al.* 1981). Ceci semble dû à une trop forte musculature de la région pelvienne réduisant son élasticité (Wiener *et al.* 2002) associée à la forte musculature des nouveaux-nés. Comme la plupart des vêlages nécessiterait une assistance vétérinaire, ce qui annulerait la rentabilité que peuvent avoir des animaux de ce

type, les éleveurs d'animaux Blanc Bleu Belges destinés à la filière viande utilisent généralement des reproductrices hétérozygotes pour la mutation mh, ce qui facilite les vèlages.

VI-5-b-Le phénotype DM chez les autres animaux d'élevage

Les races bovines ne sont pas les seules à présenter un phénotype d'hypermusculature, on l'observe également chez le mouton Texel et chez les lévriers Whippets (Walling *et al.* 2004, Mosher *et al.* 2007, Shelton et Engvall 2007 ; Figure 13). Dans ces deux cas, le phénotype est également dû à une myostatine non fonctionnelle (Clop *et al.* 2006, Mosher *et al.* 2007, Shelton et Engvall 2007). Chez le mouton, la viande de ces animaux est plus dure (Johnson *et al.* 2005) contrairement à ce qui est décrit chez le bovin, ce qui montre que la double musculature n'implique pas forcément une augmentation de la tendreté de la viande. L'apparition d'animaux culards au sein de ces espèces est due à une sélection : pour la quantité de viande chez les ovins et pour la vitesse de course chez le lévrier. En effet, il est à noter que les lévriers ne possédant qu'un seul allèle fonctionnel de la myostatine n'ont pas d'augmentation visible de la musculature mais ont des performances athlétiques supérieures par rapport aux chiens « normaux », ils sont donc recherchés, ce qui n'est pas le cas des animaux homozygotes (Figure 13) qui présentent une grande fatigabilité et qui ne sont, en général, pas conservés par les éleveurs.



Figure 13 : phénotype Double Musculature chez le mouton Texel belge et le lévrier

Photos :

- Mouton Texel belge (©INRA)
- Wendy, lévrier whippet (Dailymail, <http://www.dailymail.co.uk/news/article-467985/Meet-Incredible-Hulk-Hounds.html>)

VII-La myostatine

VII-1-Structure et fonction

Le gène de la myostatine est exprimé dans le myotome des somites en développement à partir de 9,5 jpc. Son expression perdure chez l'adulte dans tous les muscles et est parfois détectée dans le tissu adipeux. Il code pour une protéine appartenant à la superfamille des TGF β . McPherron a mis en évidence en 1997 l'action inhibitrice autocrine et paracrine de cette protéine sur la croissance musculaire en réalisant l'inactivation du gène de la myostatine chez la souris (souris *Gdf8*^{-/-}, McPherron *et al.* 1997). Cette inactivation entraîne l'apparition d'un phénotype d'hypermusculature touchant la totalité des muscles à la fois par hypertrophie (augmentation de la taille des fibres musculaires) et par hyperplasie (augmentation du nombre de fibres, Lin *et al.* 2002, Zimmer *et al.* 2002) ainsi qu'une diminution de la masse grasseuse (Lin *et al.* 2002, McPherron & Lee 2002). On constate qu'une grande partie des phénotypes d'hypermusculature décrite chez les animaux d'élevage (bovin, ovin, lévrier, etc...) et même

chez l'homme est due à des mutations touchant le gène de la myostatine (Kambadur *et al.* 1997, Lee et McPherron 1997, Schuelke *et al.* 2004, Clop *et al.* 2006, Mosher *et al.* 2007, Shelton et Engvall 2007, Hadjipavlou *et al.* 2008).

Comme la plupart des TGF β , GDF8 est produite sous la forme d'une protéine précurseur de 376 acides aminés. Ce précurseur va subir un premier clivage qui va permettre d'enlever le peptide signal de 24 aa. Le second clivage, dû à une enzyme de la famille des furines, a lieu au niveau de la séquence Arg-Ser-Arg-Arg entre les acides aminés 264 et 267. Ce clivage libère la partie N-terminal appelée propeptide (ou LAP : latency associated peptide) de 38 kDa et la partie C-terminal active de 12,5 kDa. Cette dernière est absolument identique chez l'homme, la souris, le poulet, le rat, le porc, la dinde et le chien (pour revue Lee, 2004). La myostatine est active sous forme d'un homodimère, les deux parties actives étant liées par des ponts disulfures (Figure 14). Après ce clivage, le propeptide reste lié à la partie C-terminale de façon non-covalente formant le complexe latent inactif (Lee et McPherron 2001, Thies *et al.* 2001) qui va être sécrété par la cellule. Ce complexe sera ensuite dégradé par la métalloprotéinase BMP1/Tolloid, ce qui libérera le dimère actif (Wolfman *et al.* 2003).

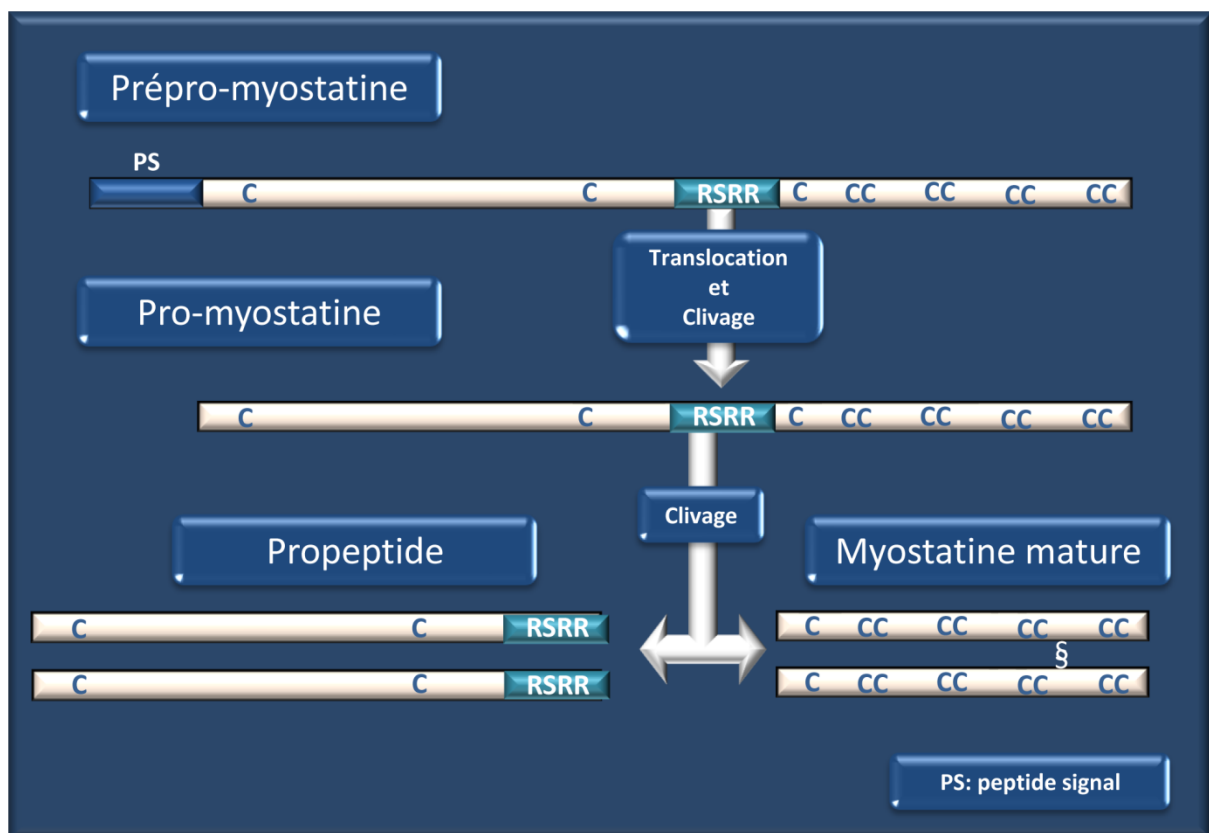


Figure 14 : maturation de la myostatine (d'après Huang *et al.* 2011)

La myostatine peut se lier aux récepteurs à sérine/thréonine kinase de type II de l'activine, ActRIIA et ActRIIB, avec toutefois une meilleure affinité pour ActRIIB. Ces récepteurs sont également ciblés par d'autres TGF β comme GDF11 (également appelé BMP11) et l'Activine, (Lee et McPherron, 1998, Thies *et al.* 2001, Rebbapragada *et al.* 2003). Les récepteurs de type I ALK4 et ALK5 sont ensuite recrutés, ce qui aboutit à l'activation de la voie des SMAD (Lee et McPherron 2001, Rebbapragada *et al.* 2003, Zhu *et al.* 2004). Plus précisément, les R-SMAD, SMAD2 et SMAD3, vont être recrutés et phosphorylés par le récepteur et vont ensuite se fixer à SMAD4 qui permettra leur translocation dans le noyau où ils pourront jouer leur rôle de facteurs de transcription (Thies *et al.* 2001, Langley *et al.* 2002). L'inhibiteur (I-SMAD) SMAD7, quant à lui, exerce un rétrocontrôle négatif sur l'action de GDF8 (Zhu *et al.* 2004). Il semblerait que d'autres voies soient impliquées, la myostatine semblant activer la voie p38 MAPK via la cascade de signalisation TAK1-MKK6 indépendamment des SMAD dans les cellules A204 et C2C12 (Philip *et al.* 2005), cette voie étant impliquée dans la prolifération cellulaire. De plus, il a été montré que l'inhibition de la différenciation et de la prolifération de myoblastes C2C12 par la myostatine active la voie ERK1/2 (Yang *et al.* 2006) et JNK (Huang *et al.* 2007) via le récepteur ActRIIB. On constate donc que la myostatine régule négativement la masse musculaire par un mécanisme très complexe impliquant différentes voies de signalisation.

Nous avons vu que les souris déficientes pour *Gdf8* présentent une augmentation de la masse musculaire due à une hypertrophie et à une hyperplasie des fibres musculaires (McPherron *et al.* 1997). Il est connu que la myostatine agit à la fois en bloquant la prolifération des myoblastes et leur différenciation, ce qui a été démontré par plusieurs études menées sur les lignées cellulaires myoblastiques C2C12 (Thomas *et al.* 2000, Rios *et al.* 2001, Taylor *et al.* 2001, Langley *et al.* 2002, Rios *et al.* 2002, Joulia *et al.* 2003). L'effet de la myostatine sur la prolifération est vraisemblablement dû au fait que GDF8 augmente l'expression de p21, qui est un inhibiteur des CDK (cyclin dependent kinase), et diminue celle de *Cdk2* ainsi que la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome. De plus, la myostatine augmente la dégradation de la cycline D1 via la voie PI3K/AKT/GSK3 β , arrêtant le cycle cellulaire en phase G1 (Yang *et al.* 2007). CDK2, qui joue un rôle dans le cycle cellulaire, rend MYOD instable et facilite sa dégradation en fin de cycle (Tintignac *et al.* 2000). Dans des conditions physiologiques, GDF8 permet donc la différenciation en arrêtant la prolifération et en permettant l'accumulation de MYOD dans les myoblastes. En cas de déficience, on observe donc que la prolifération est augmentée et qu'il y a un effet sur la

différenciation dû à une diminution de la quantité de MYOD dans les cellules. En ce qui concerne la différenciation, plusieurs études sur C2C12 montrent également une diminution de l'expression de *Myod*, *Myf5* et de la myogénine (Langley *et al.* 2002, Rios *et al.* 2002, Joulia *et al.* 2003) que l'on retrouve également sur des cultures primaires de myoblastes bovins (Thomas *et al.* 2000), ce qui explique que sans la myostatine, l'expression des MRFs, donc la différenciation des myoblastes, est augmentée.

La myostatine n'agit pas que sur la prolifération et la différenciation des cellules, elle a également un rôle sur la synthèse des protéines. En effet, il a été montré que GDF8 inhibe la synthèse protéique *in vitro* (Taylor *et al.* 2001) et que les souris dans lesquelles la myostatine est inactivée présentent une augmentation de la synthèse des protéines myofibrillaires par rapport aux sauvages (Welle *et al.* 2007). Il a également été montré que la follistatine stimule la synthèse protéique chez le rat, ce qui semble encore confirmer les résultats précédemment cités (Suryawan *et al.* 2006). Des études récentes ont montré que l'action de GDF8 sur la synthèse protéique passerait par une inhibition de la voie AKT/mTOR (Amirouche *et al.* 2009, Sartori *et al.* 2009, Trendelenburg 2009) qui joue un rôle charnière dans ce processus physiologique (Sarbasov *et al.* 2005). La myostatine semble être également impliquée dans l'obésité, où une augmentation de la masse du tissu adipeux ainsi qu'une insulino-résistance sont observées. Il a été montré que les personnes obèses présentent une surexpression de *Gdf8* (Reardon et Davis 2001, Milan *et al.* 2004, Park *et al.* 2006). On observe également une diminution de la masse grasseuse et une résistance à l'insuline induite par de forts taux de graisse sur les souris knockout pour la myostatine (McPherron et Lee 2002). Une inactivation de la myostatine spécifique du tissu musculaire a le même effet (Guo *et al.* 2009), ce qui indique que la réduction de la masse grasse est due à un effet provenant du muscle et non à un effet direct de la GDF8 sur le tissu adipeux. De plus, il a été montré récemment que la myostatine agit sur le métabolisme du glucose en favorisant sa consommation par le muscle via la voie de signalisation AMPK (Chen *et al.* 2010).

VII-2-Régulation de la myostatine

La régulation de l'expression de la myostatine est complexe et les divers facteurs permettant son expression ou sa répression ne sont pas tous connus. La région régulatrice de ce gène est très conservée chez la plupart des mammifères et comprend un grand nombre de motifs de liaison à des facteurs de transcription (Ma *et al.* 2001, 2003) parmi lesquels 10 Ebox, et des sites de liaison à MEF2, NFκB, PPARγ ainsi que des sites de liaison à des hormones comme ARE (androgen response element), GRE (glucocorticoid response element), TRE (thyroid hormone response element). Cependant, il ne s'agit que de sites prédits informatiquement et très peu de preuves biologiques permettent de savoir lesquels sont vraiment actifs. On sait néanmoins que la liaison de MyoD à l'Ebox 6 de la région régulatrice entraîne une surexpression de *Gdf8* (Spiller *et al.* 2002).

L'expression de la myostatine semble également en partie régulée par des miRNA. En effet, il a été montré que miR-208a (Callis *et al.* 2009), miR-208b (Allen *et al.* 2011) et miR-499 (Bell *et al.* 2010) ciblent la partie 3'UTR du transcrit de la myostatine. Ces miRNA semblent être surexprimés lorsque l'organisme absorbe des acides aminés essentiels (Drummond *et al.* 2009), ce qui implique une régulation de la myostatine dépendant du régime alimentaire.

En plus de ces régulations de l'expression, la myostatine est fortement régulée, comme la plupart des TGF β , de façon post-traductionnelle. En effet, l'action de BMP/Tolloid est nécessaire à la libération de la partie active, sa présence est donc indispensable à l'action de cette protéine. De plus, Anderson *et al.* ont montré en 2008 qu'une partie non négligeable de la myostatine était à l'état de pro-myostatine liée à LTBP3 (latent transforming growth factor beta binding protein 3) dans le milieu extracellulaire (Figure 15). Ceci suggère une possible action régulatrice de la furine elle-même.

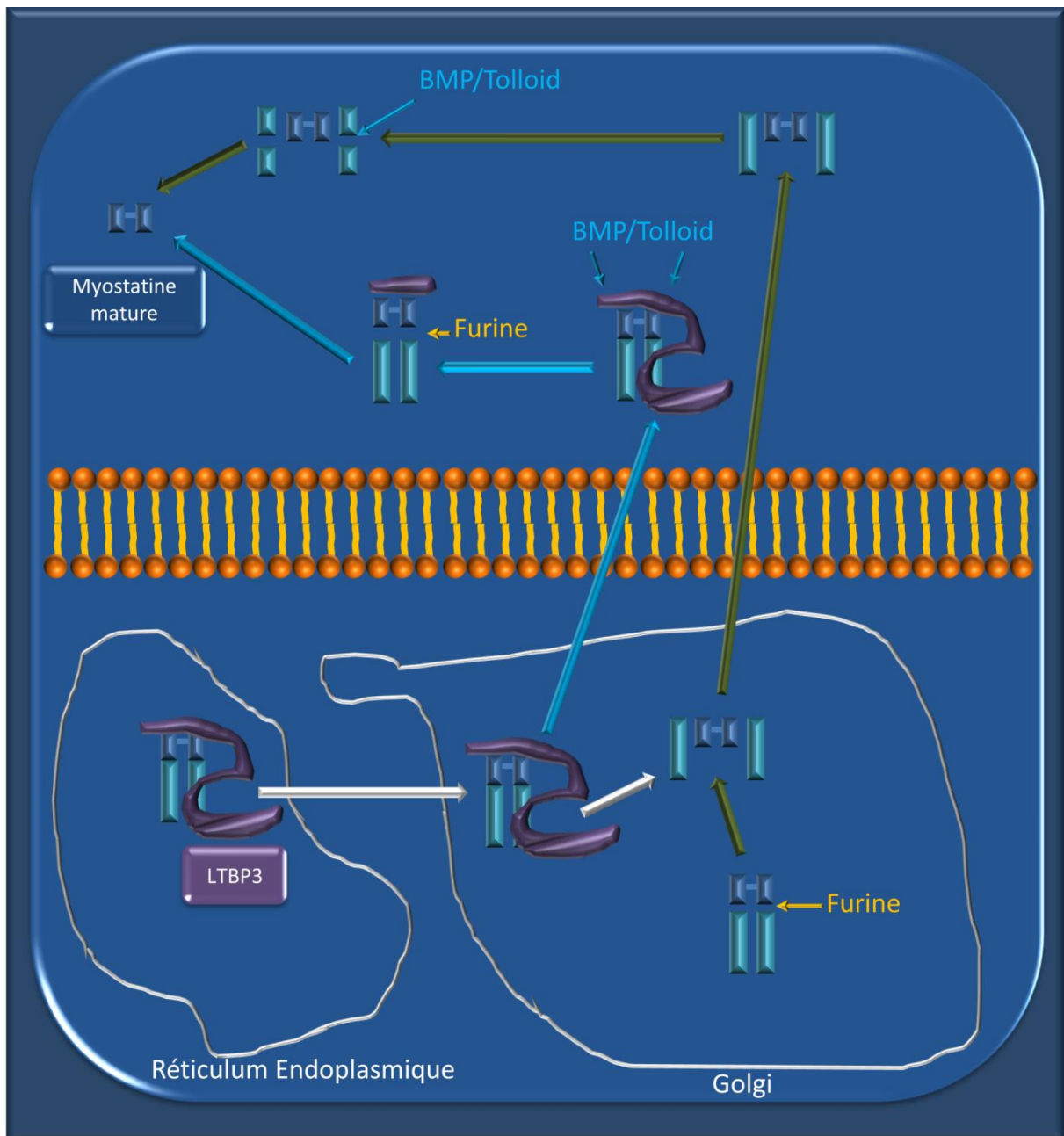


Figure 15 : régulation extra-cellulaire de la myostatine par clivage (d'après Anderson *et al.* 2008).

En dehors de cette régulation liée à la maturation de la protéine, GDF8 possède de nombreux inhibiteurs. Parmi eux, le propeptide dont il a été montré qu'il pouvait inhiber la myostatine *in vitro* par ajout de protéines purifiées (Lee et McPherron 2001, Thies *et al.* 2001) et *in vivo* grâce à des modèles murins le surexprimant (Lee et McPherron 2001, Yang *et al.* 2001). L'inhibiteur le plus puissant de la myostatine est la follistatine, initialement mise en évidence dans les fluides folliculaires pour sa capacité à inhiber la sécrétion de FSH dans les cellules pituitaires (Robertson *et al.* 1987, Ueno *et al.* 1987).

Le gène de la follistatine comporte 6 exons et peut donner deux protéines contenant chacune 3 domaines follistatine à 10 cystéines. Ces protéines sont nommées en fonction de leur taille chez l'homme : FS315 et FS288 qui sont issues d'un épissage alternatif de l'intron 5. Il existe une troisième forme FS303 issue du clivage protéolytique de FS315 mais elle n'est présente que chez le porc. Les deux protéines ne diffèrent que par la présence d'une queue C-terminale acide sur FS315. Elles peuvent se lier à un grand nombre de TGF β , notamment l'activine (Nakamura *et al.* 1990, Yamashita *et al.* 1995, De Winter *et al.* 1996, Fainsod *et al.* 1997, Iemura *et al.* 1998). Gamer *et al.* montrent en 1999 que la follistatine peut également inhiber GDF11 (Gamer *et al.* 1999). Or, le fait que GDF11 présente plus de 90% d'homologie avec GDF8 et que l'on observe une diminution de la masse musculaire des souris nouveau-nés lorsque la follistatine est inactivée (les animaux meurent peu de temps après la naissance) (Matzuk *et al.* 1995) semblaient indiquer que FST pouvait également être un inhibiteur de la myostatine. Ceci fut démontré par Lee et McPherron en 2001 qui constatent une augmentation importante et généralisée de la masse musculaire lorsque la follistatine est surexprimée (Lee et McPherron 2001). Quelques années plus tard, Amthor *et al.* (2004) montrent que l'effet de FST sur la masse musculaire est dû à un contact direct avec la myostatine qui empêche la fixation de cette dernière à son récepteur. Cependant, en croisant des souris surexprimant la follistatine avec des animaux déficients pour GDF8, Lee (2007) montre que l'action de la follistatine sur le muscle est en partie non-dépendante de la myostatine. En effet, il observe une hypermusculature beaucoup plus importante chez les doubles mutants *Fst/Gdf8*^{-/-} que chez les souris *Gdf8*^{-/-} (Lee 2007). Ceci serait dû à l'inhibition d'autres TGF β exprimés dans le muscle, et en particulier de l'activine A (Lee 2010).

La follistatine s'exprime dans les cellules du myotome au même moment que la myostatine chez le poulet (Amthor *et al.* 1996, 2002 a, b) suggérant un possible rôle physiologique d'inhibiteur de la myostatine durant la myogenèse. On peut également noter

que les souris knockout pour la follistatine (Matzuk *et al.* 1995) présentent un phénotype au niveau du squelette axial sensiblement opposé à celui observé lors de l'inactivation de *Gdf11* (McPherron *et al.* 1999), ce qui indiquerait un rôle inhibiteur de la follistatine sur GDF11.

En 2009, le cristal du complexe follistatine/myostatine a permis de lever le voile sur l'interaction entre ces deux protéines. On observe que FST se lie à GDF8 par le contact de ses domaines N-terminal, FSD1 et FSD2, le troisième domaine follistatine n'étant pas en contact avec GDF8 (Cash *et al.* 2009). Le domaine FSD1 présente un site de liaison à l'héparine qui est conservé chez la plupart des espèces. Ce dernier facilite la dégradation du complexe par les cellules avoisinantes en permettant la liaison de FST aux protéoglycanes de la surface cellulaire (Inouye, Ling et Shimasaki 1992, Sumitomo *et al.* 1995, Wang *et al.* 2000). On peut noter que seule FS288 peut se lier de cette manière, la présence de la queue C-terminale acide sur FS315 empêchant cette dernière de se lier à ces protéoglycanes (Keutman *et al.* 2004).

De nombreuses autres protéines peuvent se lier à la myostatine et inhiber son activité *in vitro* comme hSGT (Wang *et al.* 2003), Titin-cap (Nicholas *et al.* 2002) ou la décorine (Miura *et al.* 2006) mais seuls deux inhibiteurs de GDF8 ont été mis en évidence par co-immunoprécipitation dans le sang d'homme et de souris :

- FSTL3 (follistatin like 3) également appelée FLRG (follistatin related gene) est une protéine qui a une grande homologie avec la follistatine. Elle ne possède que deux domaines follistatine et ne contient pas de site de liaison aux héparanes sulfates. Il a été montré qu'elle peut inhiber la myostatine, l'activine et BMP2 *in vitro* (Hill *et al.* 2002, Hayette *et al.* 1998, Tsuchida *et al.* 2000). La surexpression dans le muscle de FSTL3 entraîne une augmentation de la masse musculaire *in vivo* qui est inférieure à ce qui est observé pour la surexpression de la follistatine (Lee 2007, Rodino-Klapac 2009). Le cristal de l'interaction entre FSTL3 et GDF8 révèle que le domaine N-terminal de FSTL3 est très spécifique de GDF8 et n'a que peu d'affinité pour l'activine. Ceci pourrait expliquer les différences de phénotypes observés (Cash *et al.* 2011).

- GASP1 (Growth and differentiation associated serum protein 1) (Hill *et al.* 2003), une grande partie de cette thèse ayant pour but de mieux comprendre ses fonctions, cet inhibiteur sera présenté en détail dans le paragraphe suivant.

VII-3-Rôle dans les phénotypes d'hypermusculature

La plupart des phénotypes d'hypermusculature décrits est due à des mutations dans le gène de la myostatine (Figure.16).

A l'heure actuelle, six mutations entraînant une perte de fonction de GDF8 sont décrites chez le bovin (Kambadur *et al.* 1997, Lee et McPherron 1998, Hadjipavlou *et al.* 2008).

- nt821(del11) est une délétion de 11 nucléotides qui entraîne la production d'une protéine tronquée. On retrouve des animaux porteurs de cette mutation dans les races Blanc Bleu Belge, Blonde d'Aquitaine, Limousine, Parthenaise, Asturiana et Rubia Gallega.
- C313Y est une substitution d'une guanine par une adénine au nucléotide 938, ce qui entraîne l'apparition d'une tyrosine à la place d'une cystéine en position 313 de la protéine. Cette cystéine est très conservée et cette mutation entraîne une perte de fonction de la myostatine. On la retrouve chez les races Gasconne et Piémontaise.
- nt419 (del7-ins10), comme son nom l'indique, correspond à une insertion/délétion dans laquelle 7 nucléotides sont remplacés par 10 pb qui n'ont apparemment aucun rapport. Ceci fait apparaître un codon stop prématuré dans la région codant le propeptide de la myostatine, aboutissant à une protéine de 140 aa sans région active. On retrouve cette mutation chez la Maine-Anjou.
- Q204X est une mutation entraînant l'apparition d'une protéine tronquée de 204 acides aminés (donc pas de partie active). Elle est due à la substitution d'une cytosine par une thymine à la position 610. On la retrouve chez les Charolaises et les Limousines.
- E226X est une substitution en position 676, ce qui fait apparaître un codon stop à l'acide aminé 226. Cette mutation est caractéristique de la Maine-Anjou.

- E291X est également une substitution d'une guanine par une thymine qui a lieu, ici, au nucléotide 874. Ceci entraîne l'apparition d'un codon stop prématuré dans la région active de la myostatine. Cette mutation est retrouvée chez la Marchigiana.

Si ces six mutations sont, à l'heure actuelle, les seules entraînant une perte de fonction totale de la myostatine, il existe de nombreux polymorphismes, notamment dans la race Limousine (D182N, F94L et S105C). Le cas de la mutation F94L est sujet à controverse. En effet, Grobet *et al.* n'avaient pas décrit, en 1998, d'effet particulier de cette mutation sur la musculature des Limousines. Les phénotypes DM de cette race semblaient donc imputables à une autre voie puisqu'aucune mutation de ce gène n'est décrite dans cette race. Cependant, trois différents groupes montrent, au contraire, des effets significatifs de cette mutation (Esmailzadeh *et al.* 2008, Lines *et al.* 2009 et Alexander *et al.* 2009). On peut noter également que les résultats de génotypage à grande échelle (projet qualvigène) d'animaux des trois principales races françaises, à savoir la Limousine, la Charolaise et la Blonde d'Aquitaine, ont montré la présence des mutations Q204X et nt821(del11) et un effet important de ces dernières sur la qualité des carcasses et de la viande des Limousines et des Charolaises (Allais *et al.* 2010), le cas des Blondes d'Aquitaine étant particulier. En effet, il semble que les animaux hypermusclés appartenant à cette race ne possèdent pas particulièrement de mutation dans le gène de la myostatine (la mutation Q204X est présente dans mais uniquement sur un faible nombre d'individus DM). De plus, les résultats obtenus par Allais *et al.* en 2009 ne montrent pas de corrélation entre les mutations Q204X ou nt821(del11) et la qualité des viandes et des carcasses d'animaux Blonds d'Aquitaine, même si on peut noter que le nombre de taurillons présentant ces mutations était très faible dans cette étude et que seuls des animaux hétérozygotes sont étudiés. La Blonde d'Aquitaine reste donc à l'heure actuelle l'une des seules races présentant des animaux hypermusclés dont le gène de la myostatine semble intact.

Une mutation a également été décrite chez les ovins Texel Belge (Clöp *et al.* 2006). Contrairement aux autres mutations connues, il s'agit d'une transition guanine vers adénine qui introduit en 3' UTR de la myostatine une région reconnue par les microARN mir-206 (très exprimé dans le muscle) et mir-1 (très exprimé dans le cœur). Ceci entraîne une forte diminution de la quantité de myostatine dans les muscles squelettiques, ce qui engendre les phénotypes observés (cf Phénotype d'hypermusculature chez les autres animaux d'élevage).

En ce qui concerne le lévrier (Mosher *et al.* 2007, Shelton et Engvall 2007), la mutation décrite est une délétion de 2 nucléotides dans l'exon 3 de la myostatine, ce qui aboutit à l'apparition d'un codon stop prématuré au niveau de l'acide aminé 313.

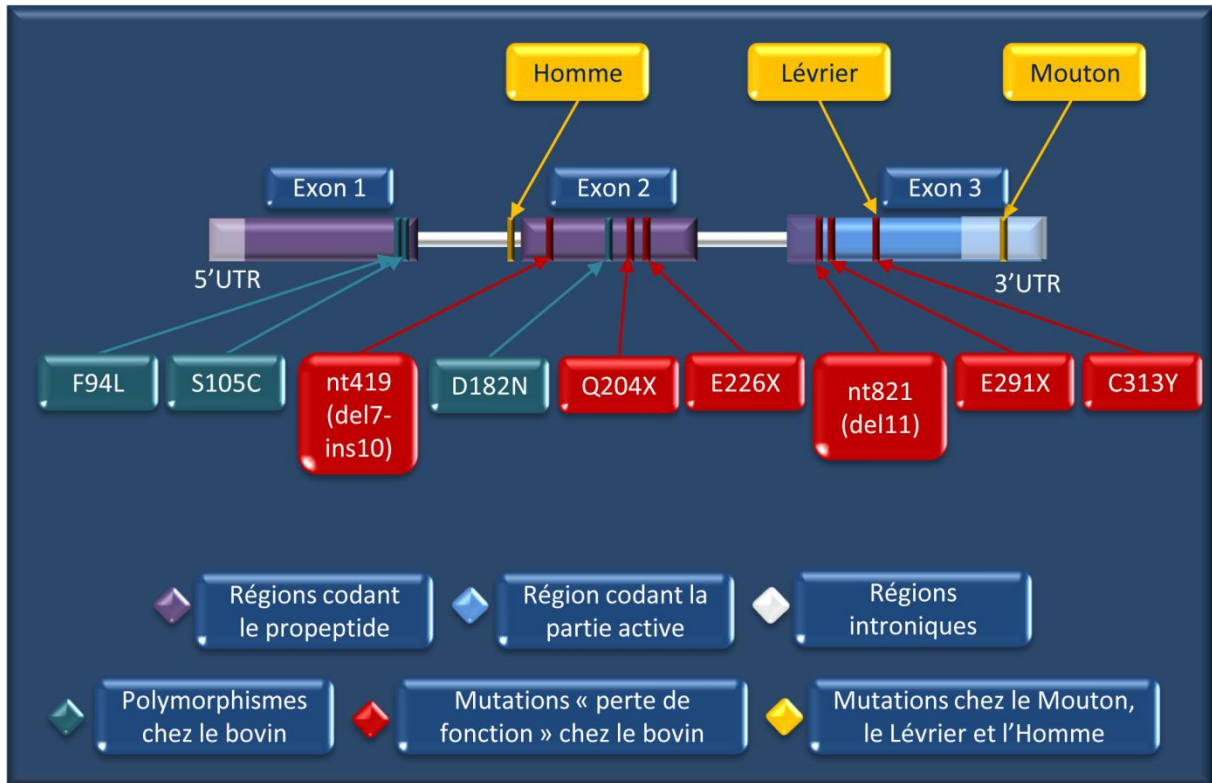


Figure 16 : mutations importantes dans le gène de la myostatine (d'après Grobet *et al.* 1997)

Pour finir, plusieurs cas ont été décrits chez l'homme bien que seul Schuelke ait publié des informations précises à ce sujet en 2004. L'étude porte sur un jeune garçon dont l'hypermusculature est importante dès la naissance et confirmée par ultrasons. De plus, on constate également une grande force, puisqu'à l'âge de 4 ans et demi, ce patient pouvait porter une charge de 3 kg dans chaque main, bras tendu. La mutation à l'origine de la perte de fonction de la myostatine est ici située dans le premier intron. La région 5' d'attache des snRNA utilisés par le spliceosome n'est plus fonctionnelle, l'intron 1 est donc conservé. Le fait qu'il contienne plusieurs codons stop dans le cadre de lecture de la myostatine entraîne la production d'une protéine tronquée. Cet enfant ne présente pas de problème cardiaque ou de problème de santé apparent ce qui laisse penser que la myostatine pourrait être un bon candidat pour soigner les pathologies entraînant une diminution du volume et de la force musculaires.

VII-4-Rôle dans les pathologies du muscle squelettique

Nous savons que l'inactivation de la myostatine entraîne des phénotypes d'hypermusculature (McPherron *et al.* 1997, Schuelke *et al.* 2004). De plus, les travaux de Zimmer *et al.* (2002) ont montré, que la surexpression de la myostatine chez la souris entraîne des syndromes cachexiques avec pertes de masse musculaire et graisseuse. Tout ceci a ouvert une nouvelle voie thérapeutique pour le soin des maladies musculaires et des cachexies (Carnac *et al.* 2006, 2007).

Beny-Klimek *et al.* (2010) et Zhou *et al.* (2010) ont travaillé sur le blocage de la myostatine sur des souris modèles de cachexie induite par des cancers. Ils ont pour cela utilisé des domaines extracellulaires du récepteur ActRIIB fusionnés à des domaines Fc d'immunoglobuline mis au point par Lee *et al.* (2005). Les deux équipes ont montré respectivement, par injection de cellules CHO (chinese hamster ovary) exprimant le récepteur modifié ou par injection directe de protéines chez la souris, que le traitement par cet inhibiteur empêchait la perte de masse musculaire induite par les différents cancers étudiés par rapport aux souris non traitées. Il semble également que la cachexie, en tout cas celle analysée dans l'étude de Zhou *et al.*, soit causée par une expression importante de myostatine puisque deux fois plus d'ARNm de la myostatine sont détectés dans les souris modèles de cancer du colon utilisées par rapport à des souris sauvages. Certains auteurs pensent que l'activine peut être impliquée dans ces processus de cachexie. Il a été montré que la surexpression de l'activine dans le muscle entraînait une atrophie musculaire qui semblerait être induite par les mêmes voies que celles de la myostatine, les deux protéines se fixant au même récepteur (Gilson *et al.* 2009). Cette surexpression de l'activine entraînerait aussi l'apparition de tumeurs, notamment au niveau des gonades, et le développement de syndromes cachexiques (Matzuk *et al.* 1992, 1994). De plus, il apparaît que les souris knockout pour *Gdf8* présentent une perte de masse musculaire liée au cancer (Beny-Klimek *et al.* 2010). Le récepteur ActRIIB modifié semble donc être le plus indiqué car il bloque à la fois la myostatine et l'activine (ainsi que d'autres TGF β). Cependant, l'activine ne paraît pas impliquée dans la cachexie induite par tous les types de cancer car l'inhibition de la myostatine via des anticorps spécifiques semble suffisante pour empêcher la diminution de la masse musculaire dans certains cancers (Murphy *et al.* 2011). Toutefois, le développement d'antagonistes spécifiques de l'activine va certainement permettre d'en savoir plus à ce sujet (Makanji *et al.* 2011).

En ce qui concerne les dystrophies musculaires, l'effet de traitements utilisant la voie de la myostatine est également étudié par de nombreuses équipes. La différence majeure avec la cachexie est que, ici, l'inhibition de GDF8 ne peut servir qu'à améliorer les symptômes et ne peut, bien entendu, pas réparer la mutation à l'origine de la maladie. De nombreuses stratégies sont utilisées sur différentes lignées murines modèles. On peut citer, par exemple, l'utilisation d'anticorps (Bogdanovich *et al.* 2002), d'inhibiteurs comme par exemple une follistatine modifiée pour être spécifique de GDF8 (Nakatani *et al.* 2008) ou de dominants négatifs (Morine *et al.* 2010).

VIII-GASP1 et GASP2

GASP1 (ou OC29 Nishida *et al.* 2004) et son homologue GASP2 sont des protéines secrétées constituées de multiples domaines (Figure 17) :

- un peptide signal de sécrétion,
- un domaine « whey acidic protein » (WAP) constitué d'une région riche en cystéines formant 4 ponts disulfures,
- un domaine follistatine/kazal que l'on retrouve dans la follistatine et les protéines de la famille des inhibiteurs kazal qui comprennent de 1 à 7 domaines de ce type,
- un domaine immunoglobuline qui est retrouvé dans des protéines ayant des fonctions très variées allant du système immunitaire à l'adhésion cellulaire,
- deux domaines kunitz constitués de 3 ponts disulfures et retrouvés en majorité chez les métazoaires,
- un domaine nétrine (NTR ou C345C) constitué de 6 cystéines et de blocs de résidus hydrophobes. On le retrouve notamment dans la partie C-terminale des nétrines ou des protéines C3, C4 et C5 du complément. Il semble être impliqué dans l'inhibition des métalloprotéinases à Zinc de la famille des metzincines.

A cause de cette organisation modulaire, les protéines GASP1 et GASP2 sont également connues sous les noms de WFIKKN (wap, follistatin, kazal, immunoglobulin, kunitz, kunitz, netrin containing protein) 2 et 1 respectivement.

A l'exception du domaine Immunoglobuline, tous ces domaines sont associés à des inhibiteurs de protéase à sérine (Trexler *et al.* 2000, Trexler *et al.* 2002, Hill *et al.* 2003).

Toutefois, seul le second domaine kunitz a été démontré actif et aurait une activité anti-trypsine (Nagy *et al.* 2003).

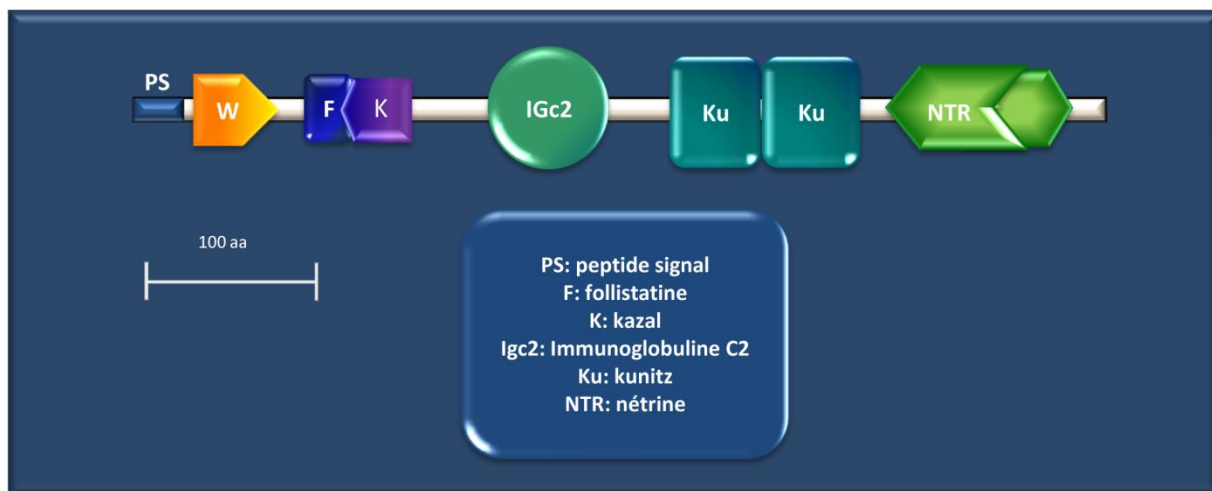


Figure 17 : structure modulaire de GASP1 murin

Les gènes *Gasp1* et *Gasp2* sont situés respectivement sur les chromosomes 11 et 17. *Gasp1* s'étend sur 6,75 kb, sa partie codante, de 3516 pb, est constituée de deux exons et est traduite en une protéine de 571 aa. En ce qui concerne *Gasp2*, sa taille est de 3,23 kb pour une partie codante de 2530 pb également constituée de deux exons et codant une protéine de 552 aa. GASP1 et GASP2 ont une homologie de séquence de 54% chez la souris. Ces deux gènes sont très conservés chez les vertébrés (Kondas *et al.* 2008). *Gasp1* se situe sur le chromosome 17 humain et 19 bovin avec des tailles respectives de 6,94 kb et 5,86 kb. La région codante est de 3588 pb chez l'homme et donne une protéine de 576 aa tandis que chez le bovin, le transcrit a une taille de 3343 pb et est traduit en une protéine de 574 aa. Les différences de taille de ces protéines par rapport à celles de la souris sont dues à des ajouts/suppressions d'acides aminés entre la position 23 et 27 de *Gasp1* humain. *Gasp2*, quant à lui, se situe sur le chromosome 16 humain et 25 bovin pour des tailles respectives de 3,19 kb et 2,53 kb. Les parties codantes ont une taille de 2028 pb chez l'homme et 1653 pb chez le bovin pour des protéines respectivement de 548 aa et 550 aa (Tableau 4).

Tableau 4 : informations sur la structure de *Gasp1*

Espèce	Chromosome	Taille gène (kpb)	Taille transcrit (pb)	Nombre exons	Taille protéine (aa)
Souris	11	6,75	3516	2	571
Homme	17	6,94	3588	2	576
Bovin	19	5,86	3343	2	574

Tableau 5 : informations sur la structure de *Gasp2*

Espèce	Chromosome	Taille gène (kpb)	Taille transcrit (pb)	Nombre exons	Taille protéine (aa)
Souris	17	3,23	2530	2	552
Homme	16	3,19	2028	2	548
Bovin	25	2,53	1653	2	550

Ces deux protéines ont été mises en évidence par Trexler au début des années 2000 (Trexler *et al.* 2001, 2002). On pense alors qu'il s'agit d'inhibiteurs de protéases, ceci semblant être confirmé par une expression assez importante dans le pancréas. En 2003, Hill *et al.* isolent WFIKKN2 qui co-immunoprécipite avec la myostatine lors d'une expérience visant à déterminer de nouveaux partenaires de cette dernière. Ils renomment donc cette protéine GASP1 et son homologue GASP2. L'étude de Hill permet également de montrer que GASP1 est capable de se lier de manière indépendante au propeptide de GDF8 mais pas à l'activine. Cette équipe met également en évidence que GASP1 inhibe l'activité de GDF8 lors de tests luciférase (Hill *et al.* 2003).

Quelques années plus tard, Kondas complète les connaissances sur l'affinité de GASP1 avec la myostatine grâce à la méthode de résonance des plasmons de surface. Elle montre ainsi que GASP1 et GASP2 possèdent une grande affinité pour la myostatine, son propeptide et GDF11, avec un rapport GASP1:GDF8 de 1:1 (Kondas *et al.* 2008) (Figure 18). L'affinité observée pour les TGF β serait liée aux domaines WAP et follistatine/kazal (Kondas *et al.* 2008) tandis que la liaison avec le propeptide ferait intervenir le domaine nétrine (Kondas *et al.* 2008). Tout ceci indiquerait que *Gasp1* et peut-être *Gasp2* seraient impliqués dans le développement musculaire via une inhibition de GDF8.

Interacting proteins	K_d value	k_a	k_d
Myostatin ^a -WFIKKN1	3.35×10^{-8}	2.91×10^3	9.73×10^{-5}
Myostatin ^a -WFIKKN2	2.86×10^{-10}	2.24×10^5	6.39×10^{-5}
GDF11 ^a -WFIKKN1	2.25×10^{-9}	4.3×10^4	9.69×10^{-5}
GDF11 ^a -WFIKKN2	1.64×10^{-10}	1.22×10^5	2.00×10^{-5}

Interacting proteins	K_d value	k_a	k_d
Myostatin ^a -ProMyo	2.35×10^{-8}	7.75×10^3	1.86×10^{-3}
Myostatin ^a -WFIKKN1	3.35×10^{-8}	2.91×10^3	9.73×10^{-5}
Myostatin ^a -WFIKKN1_WAP-FS	6.68×10^{-8}	2.98×10^3	1.99×10^{-4}
Myostatin ^a -WFIKKN1_FS	2.71×10^{-7}	1.34×10^3	3.62×10^{-4}
Myostatin ^a -WFIKKN1_KU2-NTR	2.55×10^{-6}	7.85×10^3	3.95×10^{-2}
Myostatin ^a -WFIKKN1_NTR	2.38×10^{-6}	7.00×10^4	2.49×10^{-2}
ProMyo-WFIKKN1_KU2-NTR ^a	2.44×10^{-7}	6.18×10^3	1.51×10^{-3}
ProMyo-WFIKKN1_NTR ^a	1.60×10^{-7}	4.44×10^3	7.09×10^{-4}
ProMyo-WFIKKN1 ^a	4.85×10^{-7}	5.03×10^3	2.44×10^{-3}

Figure 18 : affinités des protéines GASP avec GDF8, GDF11 et le propeptide de GDF8 (ProMyo) ainsi que différents fragments de GASP1, déterminées par résonance des plasmons de surface. (Kondas et al. 2008)

La plupart des données acquises sur *Gasp1* et *Gasp2* provient de résultats obtenus *in vitro*. Très peu d'équipes ont travaillé sur les gènes *Gasp* *in vivo*. Il a été décrit que l'injection via AAV-1 d'un plasmide contenant la partie codante de *Gasp1* sous la dépendance d'un promoteur CMV directement dans le muscle entraîne une augmentation de la musculature et de la force chez la souris (Rodino-Kaplan *et al.* 2009) (Figure 19).

Il a été également montré que *Gasp1* est surexprimé lors de la croissance longitudinale du muscle squelettique chez le rat (Aoki *et al.* 2009) ou après un entraînement en résistance chez l'homme (Saremi *et al.* 2010, Laurentino *et al.* 2001). Tout ceci suggère que *Gasp1* est impliqué dans le développement de la masse musculaire chez l'adulte.

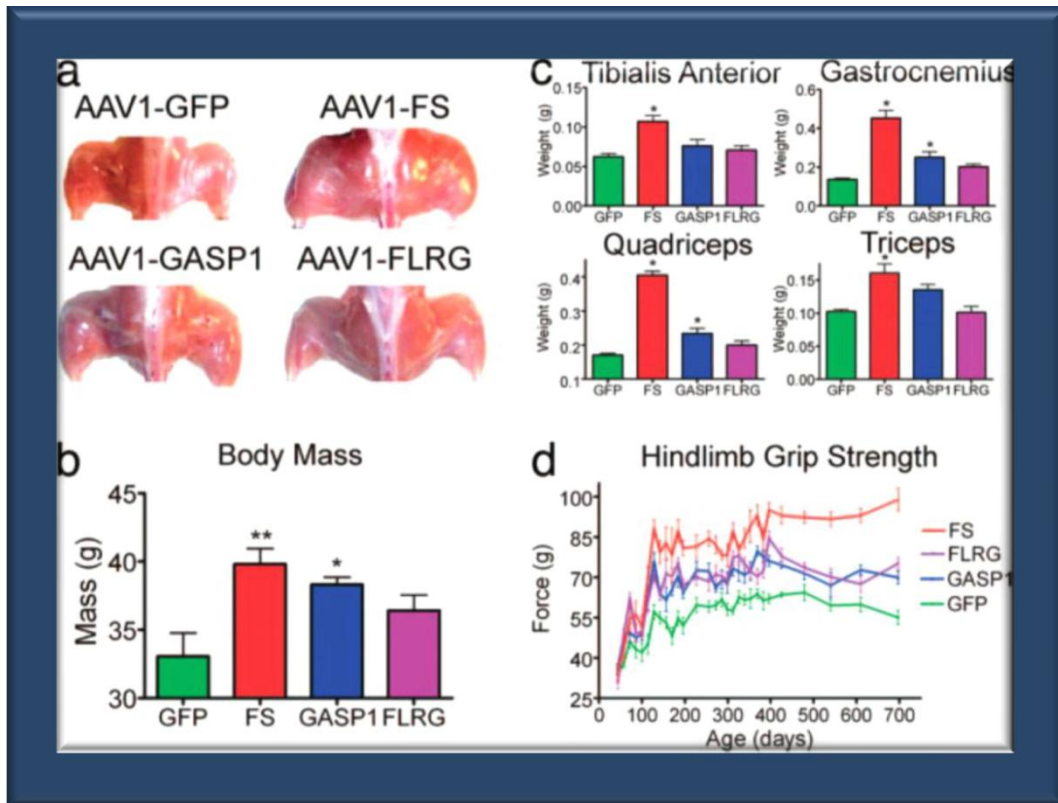


Figure 19 : effets de GASP1 *in vivo* après une injection locale de AAV1-*Gasp1*, AAV1-*Fs* (follistatine), AAV1-*Flrg* (*Fstl3*) ou AAV1-*Gfp* (contrôle). Les animaux ont subi des injections dans les membres inférieurs à l'âge de 3 semaines (Rodino-Kaplac et al. 2009)

Il est intéressant de constater que si *Gdf8* et *Gdf11* sont exprimés de manière très restreinte (muscle, squelette axial), *Gasp1* et *Gasp2* s'expriment dans de nombreux tissus durant le développement embryonnaire parmi lesquels le cerveau, le muscle squelettique, le thymus et les reins pour *Gasp1*, et les poumons, le muscle squelettique et le foie pour *Gasp2*. Chez l'adulte, *Gasp1* est exprimé dans les ovaires, les testicules, le pancréas, le cerveau et les poumons ; *Gasp2* étant, quant à lui, exprimé dans le pancréas, le thymus, le foie, les reins, les poumons, les testicules et l'oreille interne (Trexler *et al.* 2001, Trexler *et al.* 2002, Kondas *et al.* 2008). Szalma *et al.* (2010) ont récemment montré que *Gasp1* et *Gasp2* sont capables de se lier *in vitro* à TGF β 1, BMP2 et BMP4 mais n'inhibent pas leurs activités. Ces résultats indiquent que ces protéines GASP ont vraisemblablement un rôle indépendant de GDF8 et GDF11.

IX-But et stratégie d'étude

Compte tenu de l'importance de la voie de signalisation de la myostatine dans le développement et la croissance du muscle, nous avons entrepris au cours de ce travail :

1. l'étude du rôle de la protéine GASP1, partenaire inhibiteur de la myostatine identifié en 2003 mais dont le rôle lors du développement musculaire n'avait jamais été clairement démontré *in vivo*. Le modèle de souris analysé est le premier qui permet d'appréhender la fonction de *Gasp1* au cours du développement musculaire mais aussi de façon plus générale lors du développement d'autres organes puisque nous avons surexprimé *Gasp1* de façon ubiquitaire. La stratégie de notre étude a donc consisté tout d'abord à créer par transgénèse additive les lignées de souris surGasp1. La caractérisation de ces lignées montre que le phénotype majeur est un phénotype hypermusclé dont l'analyse détaillée révèle des différences avec le phénotype d'hypermusculature décrit chez des souris déficientes pour la myostatine ou chez des souris qui surexpriment la follistatine, autre inhibiteur de la myostatine (Chapitre 1 : Monestier *et al.*, soumis à BMC Genomics). En parallèle, nous avons entrepris une étude des fonctions des protéines GASP1 et de son homologue GASP2 au cours de l'évolution pour déterminer comment l'organisation modulaire de ces protéines est apparue au cours de l'évolution et si la divergence des deux gènes *Gasp* est liée au modèle de duplication (WGD : whole genome duplication) chez les premiers vertébrés (Chapitre 2 : Monestier *et al.*, soumis à PloS ONE).
2. l'analyse phénotypique et moléculaire de souris ENU présentant un phénotype hypermusclé. La stratégie utilisée pour générer cette lignée était innovante dans le sens où le crible chimique (éthyl-nitroso-urée) aléatoire était un crible dominant basé sur une sensibilisation du fond génétique par l'utilisation des souris knockout pour *Gdf8*, ce qui nous permet d'introduire un déséquilibre phénotypique pour cibler plus particulièrement notre phénotype d'intérêt « fort développement musculaire » (Chapitre 3 : Magnol L, Monestier *et al.*, Animal, 2010). La caractérisation de cette lignée a malheureusement été interrompue par la perte de la lignée lors du sinistre de l'animalerie fin 2009. La reviviscence récente de la lignée permettra de reprendre cette étude.

Chapitre 1 : Etude *in vivo* du rôle de *Gasp1* dans le muscle

Depuis son identification en 2003, la seule analyse fonctionnelle du gène *Gasp1* réalisée chez l'animal a montré que sa surexpression dans les muscles des membres postérieurs chez la souris conduisait à une augmentation du poids du corps, des muscles et de la force (Rodino-Klapac *et al.* 2009). Cependant, cette étude préclinique avait pour objectif de déterminer quel était le meilleur inhibiteur de la myostatine associé avec les vecteurs AAV-1 dans un but thérapeutique. Les auteurs ont comparé en particulier les effets de GASP1, FLRG (FSTL3) et la follistatine. Cette étude n'avait pas pour objectif d'étudier précisément les fonctions de *Gasp1 in vivo*. D'ailleurs dans ce travail, trois éléments ne permettent pas de conclure sur le rôle de *Gasp1*, en particulier dans le muscle :

1. il a été réalisé sur des animaux âgés de 725 jours sauf pour les tests de force qui présentent, quant à eux, des écarts types importants. Ces souris sont donc âgées et nous savons que des animaux de 24 mois (730 jours) présentent une forte diminution de l'aire des fibres et un enrichissement important en fibres de type IIa au détriment des fibres de type IIb par rapport à des animaux plus jeunes (Siriatt *et al.* 2006). Un biais important est donc introduit car il est impossible de savoir quel serait le phénotype avec une proportion normale en fibres. De plus, on peut difficilement conclure à une hypertrophie induite par la surexpression de *Gasp1* puisque le phénotype observé peut être simplement dû à un effet protecteur de *Gasp1* sur la dégénérescence musculaire due au vieillissement.
2. les auteurs supposent dès le début que l'action de *Gasp1* est en tout point similaire mais avec un effet moindre à celui observé pour la follistatine, ils ne se demandent jamais si le phénotype peut être différent et ne le décrivent donc pas.
3. cette étude correspond à une surexpression de *Gasp1* muscle spécifique, et ne permet donc pas de déterminer un éventuel rôle de ce gène dans le développement d'autres organes.

Dans ce contexte, un certain nombre de questions reste ouverte :

- quels sont les rôles physiologiques de *Gasp1*, et en particulier, au cours du développement musculaire ?
- la protéine GASP1 joue-t-elle un rôle dans la formation et la croissance du muscle indépendamment de la myostatine ?
- y a-t-il redondance fonctionnelle entre les gènes *Gasp1* et *Gasp2* ?

Pour apporter des éléments de réponse, mes objectifs ont été de développer et de caractériser un modèle murin qui surexprimait de façon ubiquitaire le gène *Gasp1*. La partie codante de *Gasp1* a été placée sous la dépendance du promoteur CMV (cytomégalovirus). L'injection de ce transgène a permis d'établir 6 lignées murines nommées surGasp1, déjà disponibles au laboratoire au début de ma thèse. J'ai donc retenu les deux lignées présentant la plus forte surexpression au niveau des muscles et du cerveau. Des analyses génotypiques et phénotypiques détaillées ont été entreprises (j'ai réalisé l'intégralité de ces analyses à l'exception des western blots). J'ai ainsi pu montrer que ces animaux présentent une augmentation du poids de corps d'environ 4 grammes, cette augmentation de poids est due à une augmentation du poids de chacun des muscles. Une étude histomorphométrique nous a permis de constater que cette augmentation de la masse musculaire est due à une hypertrophie des fibres de types I, IIa et IIb et pas à une hyperplasie. J'ai également constaté que les proportions de chaque type de fibres ne varient pas de manière significative dans le muscle, ce qui est confirmé par une étude de l'activité d'enzymes des métabolismes oxydatif et glycolitique musculaires. Les souris surGasp1 ne présentent pas de diminution de la masse graisseuse. L'ensemble de ces résultats qui révèle des différences par rapport au phénotype hypermusclé observé chez des souris *Gdf8*^{-/-} ou des souris qui surexpriment la follistatine, autre inhibiteur de la myostatine, font l'objet de la publication suivante soumise à BMC Genomics.

**Publication 1: *In vivo* characterization of the role of
Gasp1 in skeletal muscle function**

Olivier Monestier, Caroline Brun, Katy Heu, Bruno Passet, Mélanie Malhouroux, Laetitia Magnol, Jean-Luc Vilotte and Véronique Blanquet

Soumis à BMC Genomics

***In vivo* characterization of the role of *Gasp1* in skeletal muscle function**

Olivier Monestier¹, Caroline Brun¹, Katy Heu¹, Bruno Passet², Mélanie Malhouroux¹, Laetitia Magnol¹, Jean-Luc Vilotte² and Véronique Blanquet^{1§}

¹ UMR1061-INRA, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Université de Limoges, 87060 Limoges, France

² UMR1313 GABI Génétique Animale et Biologie Intégrative, INRA Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex, France

§ Corresponding author

Email addresses:

OM: olivier.monestier@etu.unilim.fr

CB: caroline.brun@etu.unilim.fr

KH: katy.heu@etu.unilim.fr

BP: bruno.passet@jouy.inra.fr

MM: melanie.malhouroux@unilim.fr

LM: laetitia.magnol@unilim.fr

JLV: jean-luc.vilotte@jouy.inra.fr

VB: veronique.blanquet@unilim.fr

Résultats complémentaires

Les travaux présentés précisent le rôle de *Gasp1* au cours du développement musculaire. Cependant, le phénotype observé diffère légèrement de celui décrit lors de l'inactivation de la myostatine ou de la surexpression de la follistatine. Pour évaluer les conséquences de la surexpression de *Gasp1* sur différentes voies de signalisation (AKT, IGF, MAPK,...), j'ai entrepris une étude du transcriptome musculaire des lignées surGasp1.

Matériels et méthodes

La technologie Taqman® sous la forme de plaques TLDA (Taqman low-density array, Applied Biosystems, Foster City, USA) a été utilisée. Nos plaques permettent d'analyser l'expression de 96 gènes dont 5 de référence (Tableau 6) pour quatre animaux par plaque.

Les ARN totaux ont été extraits à partir de quadriceps de 4 animaux sauvages, 4 animaux de la lignée Surgasp1-06 et 4 animaux de la lignée surGasp1-20 sur colonnes de silice après traitement à la protéinase K grâce au kit RNeasy fibrous tissues (Quiagen). La concentration des ARN est déterminée par dosage au NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Leur qualité est ensuite vérifiée par micromigration sur un Bioanalyseur 2100 (Agilent). Seuls les échantillons possédant un RIN supérieur à 7,5, attestant d'une bonne qualité, sont utilisés pour l'étude. 1,5 µg de chaque ARN est ensuite rétrotranscrit avec le high-capacity cDNA transcription Kit (Applied Biosystems). L'étude est réalisée avec un ABI PRISM® 7900, 100 ng d'ADNc sont déposés dans chaque réservoir de la plaque.

Les données sont ensuite analysées grâce aux logiciels SDS 3.0 et DataAssist 3.0 par la méthode des $\Delta\Delta Ct$ (cycle threshold). Cette méthode permet la quantification de l'expression relative d'un gène dans un échantillon d'intérêt par rapport à un échantillon dit calibrateur. L'expression de chaque gène est normalisée en fonction de l'expression des gènes de référence qui témoigne de la quantité d'ADN présent lors de chaque réaction. On passe donc par trois étapes :

1. normalisation par rapport au gène de référence : $\Delta Ct = Ct \text{ gène cible} - Ct \text{ gène de référence}$
2. normalisation par rapport à l'échantillon calibrateur : $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ calibrateur}$
3. calcul de la quantité relative : $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Tableau 6 : liste des gènes présents sur la plaque TLDA

<i>nom du gène</i>	<i>Type</i>	<i>référence de la sonde</i>
18S	Gène de référence	Hs99999901_s1
Acvr1	Gène cible	Mm01331069_m1
Acvr1b	Gène cible	Mm00475713_m1
Acvr1c	Gène cible	Mm03023957_m1
Acvr2a	Gène cible	Mm00431657_m1
Acvr2b	Gène cible	Mm00431664_m1
Aebp1	Gène cible	Mm00477402_m1
Akt1	Gène cible	Mm01331626_m1
Akt2	Gène cible	Mm02026778_g1
Akt3	Gène cible	Mm00442194_m1
Axin1	Gène cible	Mm01299063_m1
Bmp2	Gène cible	Mm01340178_m1
Bmp3	Gène cible	Mm00557790_m1
Bmp4	Gène cible	Mm01321704_m1
Casp9	Gène cible	Mm00516563_m1
Ccnd1	Gène cible	Mm00432359_m1
Ccne1	Gène cible	Mm00432367_m1
Cdk2	Gène cible	Mm00443947_m1
Cdk4	Gène cible	Mm00726334_s1
Cdk6	Gène cible	Mm01311342_m1
Ckm	Gène cible	Mm00432556_m1
Ctnnb1	Gène cible	Mm00483033_m1
Cyp2b10	Gène cible	Mm01972453_s1
Dctn6	Gène cible	Mm00495994_m1
Dffa	Gène de référence	Mm00438410_m1
Fbxo32	Gène cible	Mm00499523_m1
Fcgrt	Gène de référence	Mm00438887_m1
Foxo1	Gène cible	Mm00490671_m1
Foxo3	Gène cible	Mm01185722_m1
Foxo4	Gène cible	Mm00840140_g1
Fst	Gène cible	Mm00514982_m1
Fstl3	Gène cible	Mm00473194_m1
Gapdh	Gène de référence	Mm99999915_g1
Gasp1	Gène cible	Mm00725281_m1
Gasp2	Gène cible	Mm01308311_m1
Gdf11	Gène cible	Mm01159973_m1
Gsk3b	Gène cible	Mm00444911_m1
Igf1	Gène cible	Mm01228180_m1
Igf1r	Gène cible	Mm00802831_m1
Igf2	Gène cible	Mm00580426_m1
Inha	Gène cible	Mm00439683_m1
Inhbb	Gène cible	Mm01286587_m1
Map2k2	Gène cible	Mm00445688_m1
Map2k3	Gène cible	Mm00435950_m1

Map2k4	Gène cible	Mm00436508_m1
Map2k5	Gène cible	Mm00488652_m1
Map2k6	Gène cible	Mm00803694_m1
Mapk1	Gène cible	Mm00442479_m1
Mapk10	Gène cible	Mm00436518_m1
Mapk3	Gène cible	Mm01973540_g1
Mapk7	Gène cible	Mm00839961_g1
Mapk8	Gène cible	Mm00489514_m1
Mapk9	Gène cible	Mm00444239_m1
Mdm2	Gène cible	Mm01233136_m1
Mstn	Gène cible	Mm01254559_m1
Mtor	Gène cible	Mm00444968_m1
Myf5	Gène cible	Mm00435125_m1
Myf6	Gène cible	Mm00435126_m1
Myh1	Gène cible	Mm01332489_m1
Myh13	Gène cible	Mm01329439_m1
Myh2	Gène cible	Mm01332564_m1
Myh3	Gène cible	Mm01332463_m1
Myh4	Gène cible	Mm01332518_m1
Myh6	Gène cible	Mm00440359_m1
Myh7	Gène cible	Mm00600555_m1
Myh7b	Gène cible	Mm01249941_m1
Myh8	Gène cible	Mm01329494_m1
Myod1	Gène cible	Mm00440387_m1
Myog	Gène cible	Mm00446194_m1
Nodal	Gène cible	Mm00443040_m1
p18	Gène cible	Mm01279964_g1
Pak2	Gène cible	Mm01170646_m1
Pax3	Gène cible	Mm00435493_m1
Pax7	Gène cible	Mm00834079_m1
Pdpk1	Gène cible	Mm00440707_m1
Pparg	Gène cible	Mm01184322_m1
Rps6kb1	Gène cible	Mm01310033_m1
Smad1	Gène cible	Mm00484721_m1
Smad2	Gène cible	Mm00487530_m1
Smad3	Gène cible	Mm01170760_m1
Smad4	Gène cible	Mm03023996_m1
Smad5	Gène cible	Mm03024001_g1
Smad6	Gène cible	Mm00484738_m1
Smad7	Gène cible	Mm00484742_m1
Smad9	Gène cible	Mm00649885_m1
Smurf1	Gène cible	Mm00547102_m1
Smurf2	Gène cible	Mm03024086_m1
Syp	Gène cible	Mm00436850_m1
Tbp	Gène de référence	Mm00446973_m1
Tgfb1	Gène cible	Mm01178819_m1

Tgfb2	Gène cible	Mm00436955_m1
Tgfb1	Gène cible	Mm00436964_m1
Tgfb2	Gène cible	Mm00436977_m1
Tgfb3	Gène cible	Mm00803538_m1
Tnf	Gène cible	Mm00443258_m1
Trim63	Gène cible	Mm01185221_m1

Résultats et discussion

Parmi les 91 gènes cibles, on note que seuls *Ccne1*, *Cdk6*, *Cyp2b*, *MapK10*, *Myh13*, *Nodal*, *Pax3*, *Pax7*, *Smad9*, *Tnf* et *Gasp2* présentent une expression trop faible dans le muscle adulte pour être analysés. Très peu de variations sont observées sur les lignées mutantes surexprimant *Gasp1*, quelques gènes sont surexprimés de façon spécifique à l'une des deux lignées, ce qui est probablement dû au point d'insertion du transgène. En revanche, on remarque que cinq gènes présentent une variation d'expression à la fois sur les lignées surGasp1-06 et surGasp1-20 : le gène codant le récepteur à l'activine 1c, la myosine embryonnaire (*Myh3*) et *Ppar α* sont légèrement sous-exprimés tandis que la cycline D1 et *Myod1* sont faiblement surexprimés (Figure 20). Nous ne retrouvons donc pas la diminution de l'expression des myosines de type I observée par Steelman (Steelman *et al.* 2006) dans les *pectoralis major* de souris âgées de 5 semaines dont la myostatine a été inactivée.

En revanche, tous ces résultats semblent liés à la voie des β -caténines. En effet, la surexpression de *Myod1* (Tajbakhsh *et al.* 1998, Borello *et al.* 2006) et de la cycline D1 (Diehl *et al.* 1998) peut être due à une augmentation de l'activation de la voie WNT/ β -caténine tout comme la diminution de l'expression de *Ppar α* (Hoshiba *et al.* 2009) et de *Myh3*. Seule l'expression du récepteur à l'activine 1c ne semble pas directement liée à cette voie mais pourrait dépendre de l'activité du récepteur ActRIIB sur lequel se fixe la myostatine.

Ceci semble indiqué que *Gasp1* pourrait être une cible thérapeutique de choix car il perturbe peu l'expression des autres gènes lorsqu'il est surexprimé. Il serait intéressant de tester un panel de gènes non spécifiques du muscle ainsi que différents organes pour vérifier si *Gasp1* a des effets majeurs sur d'autres réseaux de gènes. L'action de *Gasp1* sur le muscle semble dépendante de la myostatine car tous les gènes variant en expression sont liés à la voie WNT/ β -caténine qui est elle-même réprimée par la myostatine (Steelman *et al.* 2006, Bernardi *et al.* 2011). Les données d'expression présentées ici ne constituent qu'une première

étape. Les gènes testés sont faiblement exprimés et varient peu, ce qui nécessite de recommencer cette étude sur un plus grand nombre d'animaux et avec une quantité d'ADN supérieure. De plus, la même étude sur des animaux âgés de 3 semaines va être réalisée pour vérifier l'expression des gènes durant la phase de croissance néonatale. Une étude du protéome total de muscle de souris surGasp1-06 et surGasp1-20 âgées de 3 et 12 semaines est également en cours. Des conclusions plus précises sur les causes de l'hypermusculature observée suite à la surexpression de *Gasp1* ne pourront être claires que lorsque l'étude sera complétée.

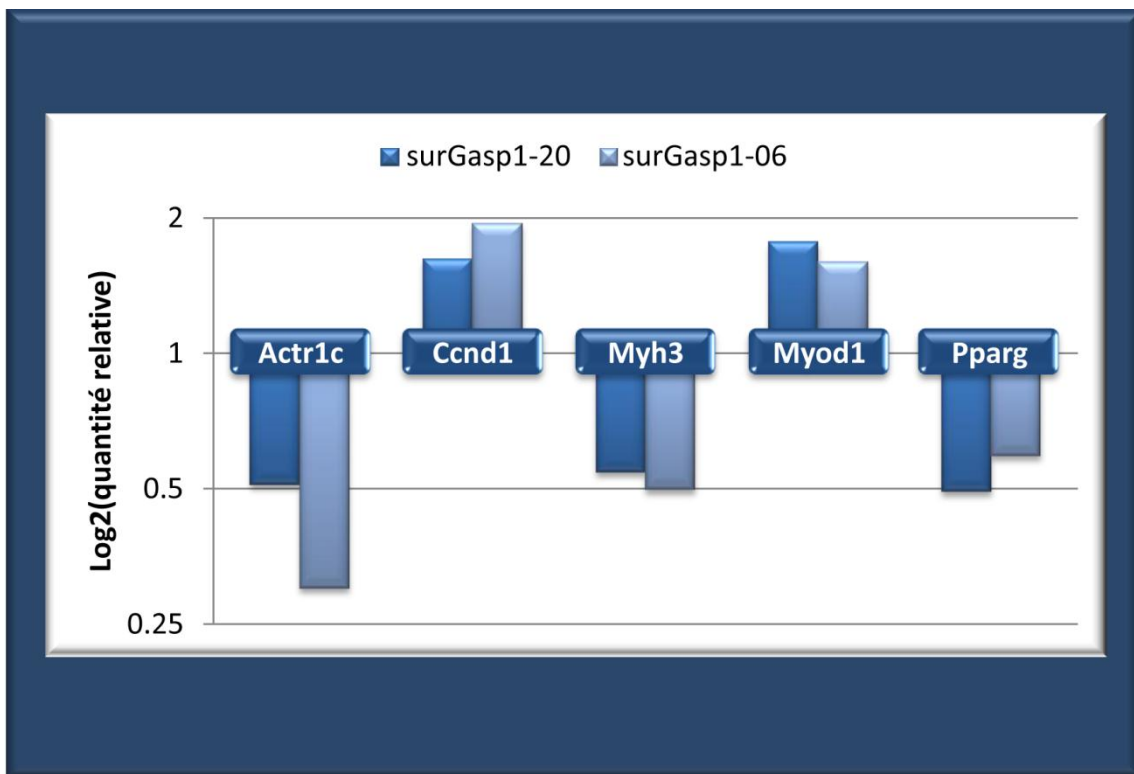


Figure 20 : gènes variant sur les animaux âgés de 12 semaines

Chapitre 2 : Aspects évolutifs des fonctions de GASP1 et GASP2

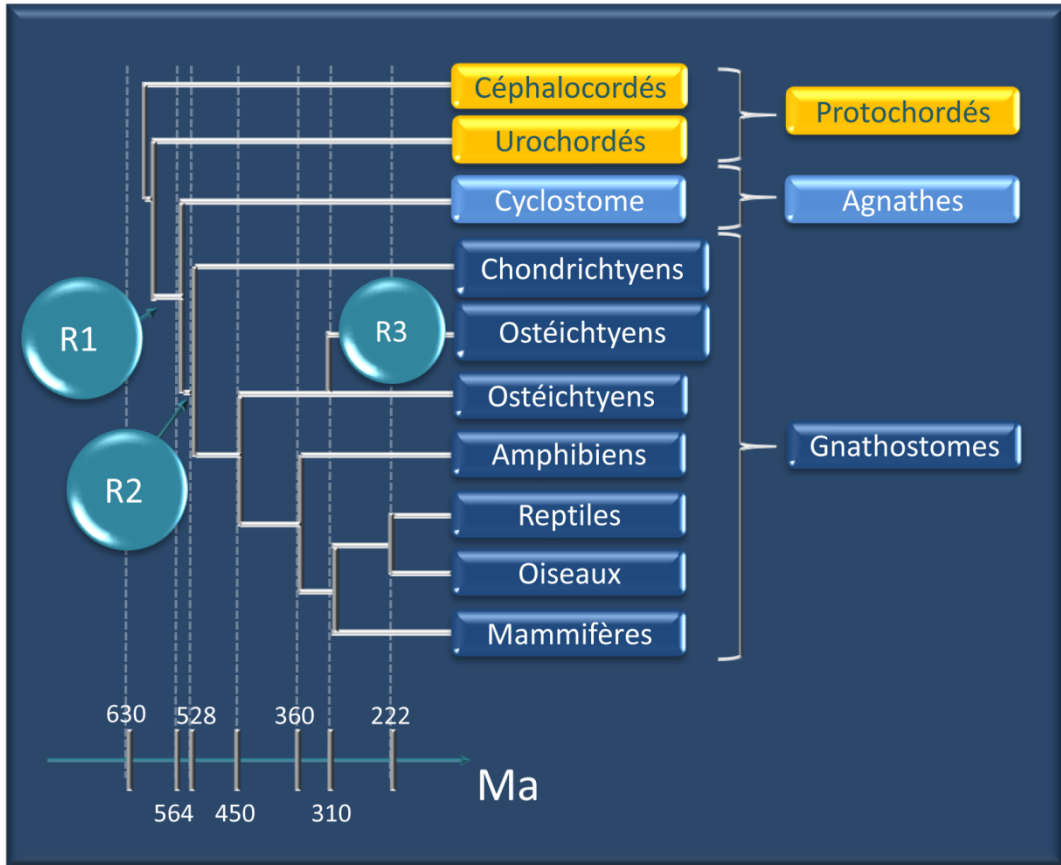


Figure 21 : théorie des deux duplications complètes du génome

A l'heure actuelle, la technologie de séquençage permet l'acquisition d'une grande quantité de données en un temps relativement court générant une masse colossale d'informations sur les génomes de nombreuses espèces, accessible à la communauté scientifique. Le facteur limitant n'est plus aujourd'hui la technique mais l'analyse de tous les résultats produits. Les approches évolutives de comparaison de séquences nucléotidiques et protéiques constituent un outil important pour l'interprétation de ces données. Ces méthodes sont apparues il y a une trentaine d'années et ont déjà permis de confirmer ou d'infirmer un certain nombre d'hypothèses de l'ère « pré-génomique ». On sait par exemple aujourd'hui, grâce à l'analyse d'un grand nombre de gènes, que les rongeurs font partie d'un groupe monophylétique (Madsen *et al.* 2001, Murphy *et al.* 2001), ce qui était rejeté quelques années plus tôt (Graur *et al.* 1991, D'Erchia *et al.* 1996).

Dans son livre intitulé « Evolution by gene duplication » paru en 1970, Susumu Ohno avance l'idée que le génome des vertébrés aurait subi une ou deux duplications complètes (Whole Genome Duplication, WGD). Cette hypothèse a depuis été affinée par de nombreuses études et est aujourd'hui appelée « two round (2R) hypothesis ». Elle stipule que le génome des vertébrés à mâchoire (Gnathostomes) a subi deux WGD après l'émergence des Urochordés et avant l'apparition des Gnathostomes (Figure 21). Cette hypothèse implique qu'à chaque WGD, le nombre de gènes est multiplié par deux, chaque « double » n'étant plus sujet à une pression de sélection et pouvant donc muter et disparaître ou acquérir une nouvelle fonction. Ceci permet donc d'expliquer l'apparition des clusters de gène. Durant les dix dernières années, cette hypothèse a fait l'objet d'intenses débats (Van de Peer 2004, Panopoulou 2005). Une hypothèse alternative explique que l'augmentation de la taille des génomes serait due à des duplications en tandem. Cependant, aucun argument irréfutable ne vient contredire l'hypothèse des 2R et, d'après Kasahara (Kasahara 2007), le débat va bientôt se clore et l'hypothèse de Ohno devrait être admise universellement grâce aux nombres importants d'études la confirmant et aux plus grands nombres de génomes disponibles.

Les gènes *Gasp1* et *Gasp2* étant homologues, j'ai choisi d'étudier l'évolution de leur séquence protéique afin de déterminer à quel « round » de duplication a lieu leur séparation et quelles régions de la protéine subissent la pression de sélection la plus importante, tout ceci dans le but d'approfondir les connaissances de la fonction physiologique de *Gasp1* et de *Gasp2* (j'ai réalisé l'intégralité des expérimentations à l'origine des résultats présentés dans ce chapitre à l'exception de l'hybridation *in situ* sur les embryons de souris).

Une recherche bioinformatique a révélé que la protéine GASP était présente avec tous ses domaines chez tous les deutérostomiens. Il apparaît que la séquence codante du gène ancestral à l'origine de *Gasp1* et *Gasp2* résulte de la fusion de deux gènes voisins présents chez les premiers métazoaires. Nous avons pu également montrer que les gènes *Gasp* ont divergé lors de la première duplication des génomes (R1).

Nous avons calculé les taux de substitutions dans les différents sites de la protéine afin de comparer les variations dans chaque domaine de l'ancêtre de *Ciona* aux poissons et aux mammifères. Dans ces derniers, le domaine follistatine/kazal est mieux conservé dans les protéines GASP1 que dans les protéines GASP2, ce qui suggère une plus forte interaction de GASP1 avec la myostatine. Ce résultat est soutenu par des taux de substitutions similaires dans les trois domaines follistatine/kazal de la protéine follistatine. Nous montrons également que le premier domaine kunitz est plus variable que le second, ce qui peut être en relation avec un effet antiprotéase réduit. Lorsque nous retraçons l'évolution des taux de substitution au cours de l'évolution des deutérostomes, nous observons une augmentation progressive de la conservation dans le domaine follistatine de l'ancêtre de *Ciona* jusqu'aux premiers vertébrés. Les résultats obtenus nous permettent de proposer que GASP1 a subi un « raffinement » de la fonction de son domaine follistatine chez les premiers vertébrés. De même, il y a une stabilisation progressive de la séquence du domaine nétrine à partir de l'ancêtre de *Ciona* jusqu'aux poissons et mammifères. L'implication de ce domaine dans une éventuelle interaction avec la myostatine ne semble pas évidente avant la séparation entre GASP1 et GASP2. Le fait que les domaines follistatine et nétrine, essentiels à l'interaction avec GDF8 et GDF11, soient les plus conservés nous permet de conclure que les protéines GASP ont toujours été capables d'interagir avec ces deux facteurs.

Publication 2: GASP/WFIKKN proteins: evolutionary aspects of their functions

Olivier Monestier, Caroline Brun, Olivier Cocquempot, Daniel Petit, Véronique
Blanquet

Soumis à PLoS ONE

Chapitre 3 : Analyses phénotypique et
moléculaire d'une lignée de souris ENU :
la lignée GMA06

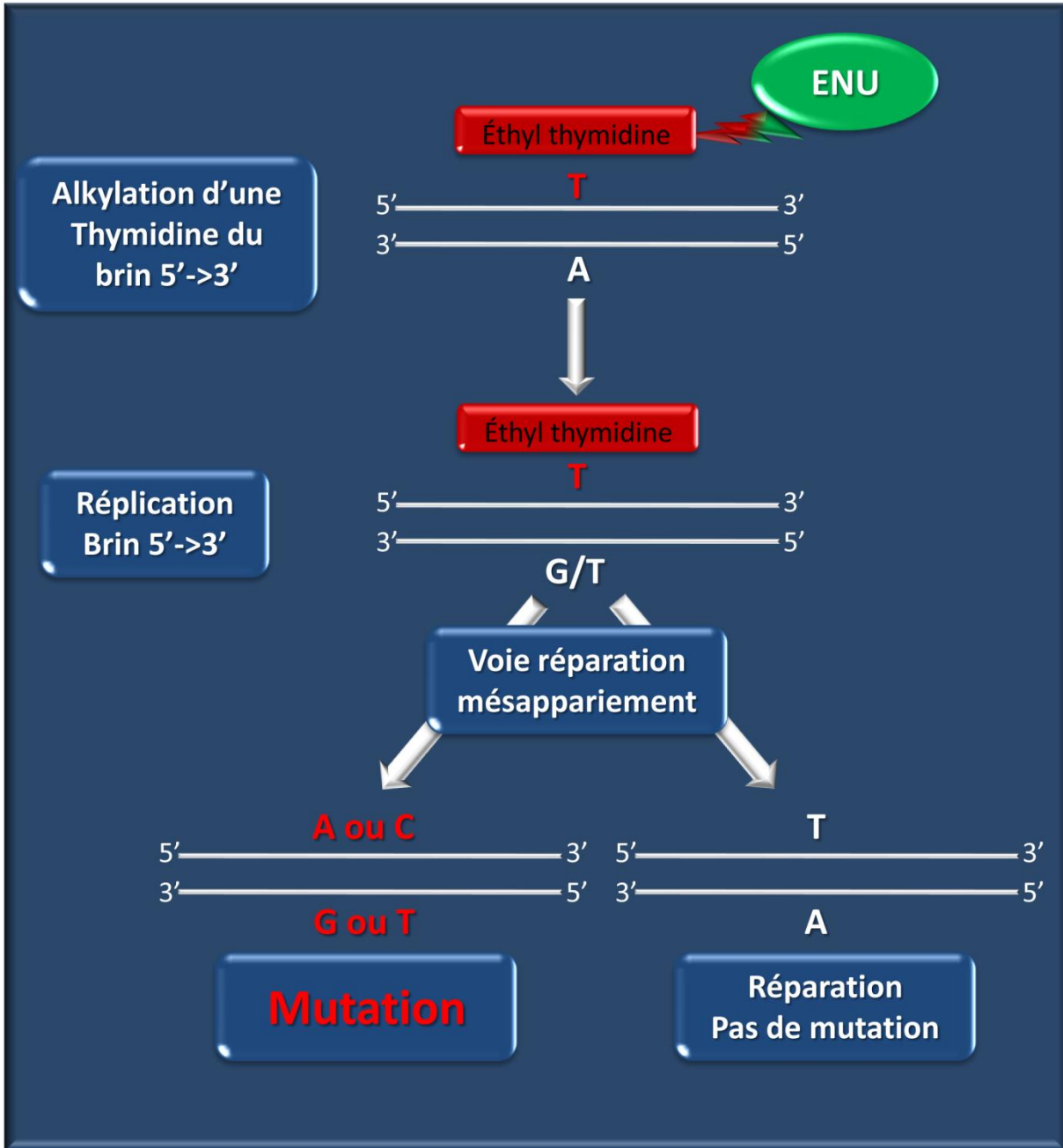


Figure 22 : mutations causées par l'ENU

Crible de mutagenèse à l'éthyl-nitroso-urée (ENU)

En parallèle des approches dites de « génétique inverse » qui consistent à modifier un gène (knockout, knockin, etc.), des méthodes de génétique « classique » ou « forward » sont toujours d'actualité. Pour cela, des animaux sont mis en présence de mutagènes chimiques créant des mutations aléatoires au sein de leur génome. Ces animaux sont ensuite sélectionnés pour un phénotype puis la mutation est identifiée par cartographie génique

Des programmes de mutagenèse sont utilisés depuis plusieurs décennies chez de nombreuses espèces animales ou végétales comme la drosophile (Gans *et al.* 1975), *Caenorhabditis elegans* (Kemphues *et al.* 1988), *Arabidopsis thaliana* (Mayer 1991), le poisson-zèbre (Driever 1996) ou, plus récemment, chez la carpe (Jiang *et al.* 2011) et ont permis d'identifier un grand nombre de gènes impliqués dans des différents processus physiologiques.

De grands projets de mutagenèse ENU (éthyl-nitrosourée) ont débuté chez la souris en 1997 en Allemagne et en Grande Bretagne (Brown *et al.* 1998, Hrabe de Angelis *et al.* 1998, 2000, Nolan *et al.* 2000) dans le but de mettre en place des infrastructures pour des études de génomique fonctionnelle en anticipant la fin du séquençage du génome humain. Parmi tous les mutagènes existants l'ENU, un puissant agent alkylant, a été choisi pour des études sur la souris car il est le plus efficace sur ces animaux (Russel *et al.* 1979). Il permet l'induction de substitutions ponctuelles dans les spermatogonies, ce qui induit des mutations transmissibles à la descendance (Noveroske *et al.*, 2000). On estime que l'ENU engendre une mutation par locus pour un gamète sur 700 lorsqu'il est administré à une dose optimale (Russel *et al.* 1982, Hitotsumachi *et al.* 1985). L'ENU permet, grâce au transfert de son groupement éthyl sur une thymidine, l'appariement de cette dernière avec une guanine ou une thymidine, ce qui aboutit à une mutation si ce mésappariement n'est pas réparé pendant la réplication de l'ADN. La majorité des mutations observées sont donc des transversions AT vers TA (44%) ou des transitions AT vers GC (38%) (Justice *et al.* 1999), ce qui a pour conséquence un fort taux de mutations des gènes riches en AT. Cependant, des transitions GC vers TA sont également observées (Coghill *et al.* 2002) (Figure.22).

Afin de proposer une stratégie alternative aux grands programmes basés sur des approches quantitatives (QTL) chez le bovin pour l'identification de régions/gènes d'intérêt contrôlant la croissance du muscle, l'Unité de Génétique Moléculaire Animale a mis en place

en 2006 un crible de mutagenèse aléatoire à l'ENU chez la souris pour identifier des mutations conduisant à des anomalies du système squeletto-musculaire. Il s'agit d'un crible dominant basé sur une sensibilisation du fond génétique grâce à l'utilisation des souris knockout pour la myostatine. Les souris *Gdf8*^{-/-}, qui présentent une augmentation de la taille des muscles striés due à une hypertrophie et une hyperplasie musculaire, une adiposité réduite et une augmentation de la densité minérale osseuse, sont croisées avec des souris mâles traitées à l'ENU pour produire les animaux F1. Une telle démarche nous permet d'introduire un déséquilibre phénotypique pour cibler plus particulièrement notre phénotype d'intérêt « fort développement musculaire ». En effet, les animaux F1 obtenus présentent tous un allèle muté pour *Gdf8* et les mutations ENU interagissant de façon directe ou non avec la voie de signalisation de la myostatine entraînent un phénotype « hypermusclé » plus facilement identifiable (Figure 23). L'élément clé d'une telle stratégie est la pertinence des paramètres phénotypiques retenus : notre crible musculaire repose sur la morphologie, des explorations biochimiques et des analyses hématologiques.

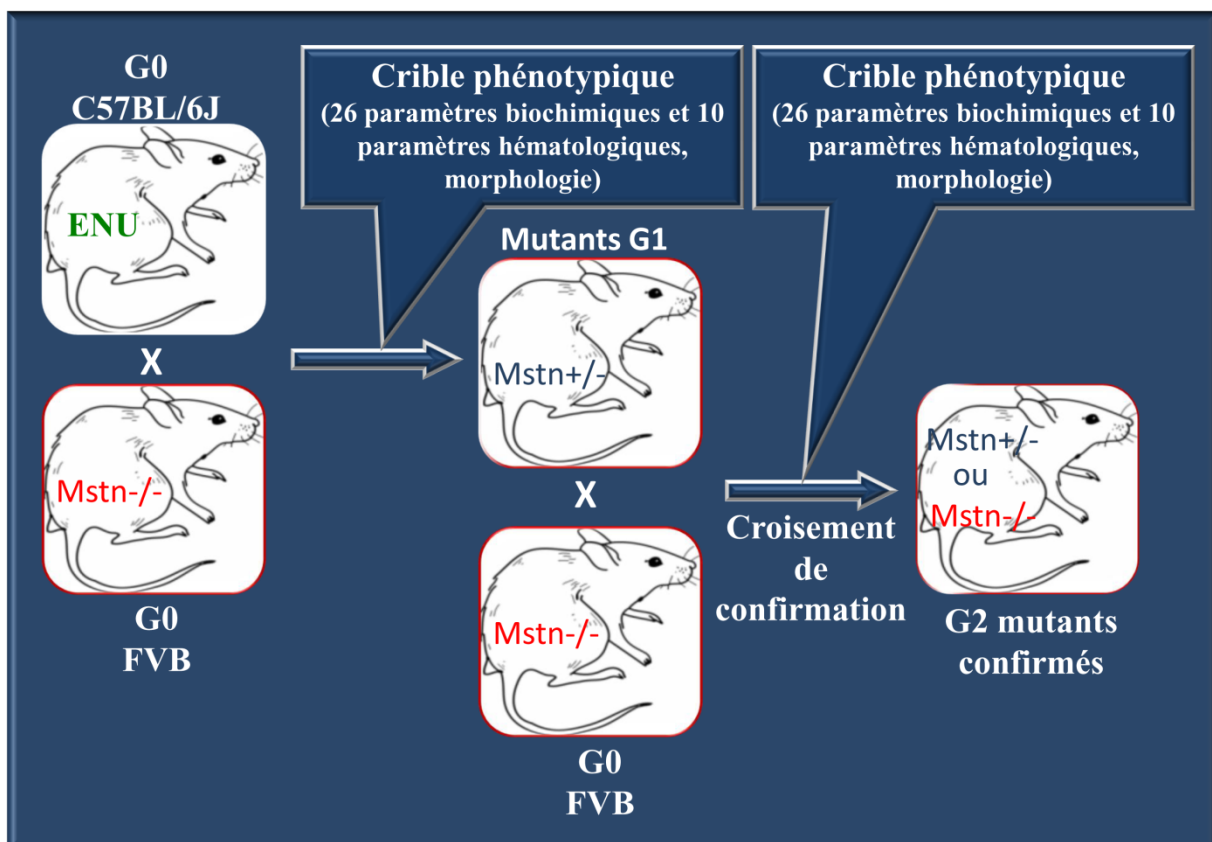


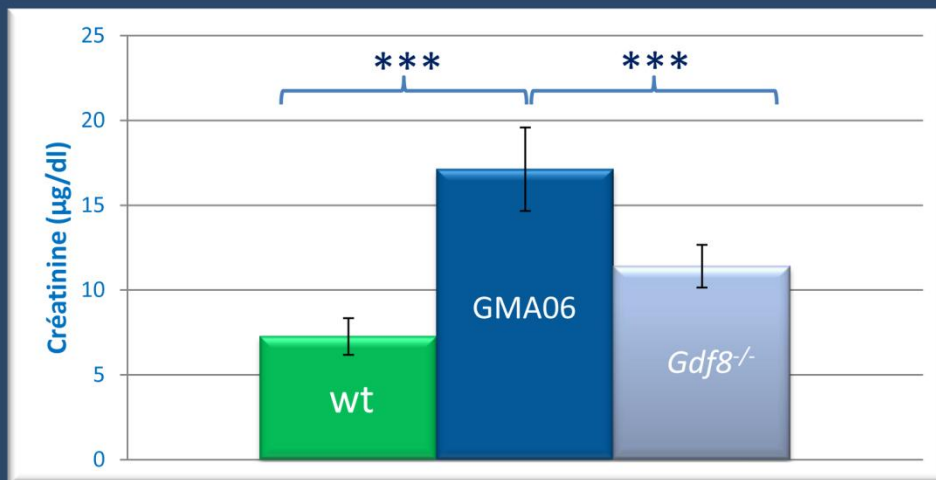
Figure 23 : crible sensibilisé réalisé au sein de l'UGMA

Avant d'être accidentellement interrompu fin 2009, ce crible a permis de générer 7 lignées murines : 6 présentes des défauts squelettiques plus ou moins sévères et la dernière, nommée GMA06, présente une hypermusculature associée à un fort taux de créatinine plasmatique. J'ai entrepris des analyses fonctionnelles aux niveaux phénotypique et moléculaire de la lignée GMA06 (caractérisation musculaire et identification de la mutation responsable).

L'étude phénotypique m'a permis de montrer que nos animaux présentaient un poids 43% supérieur à celui des animaux sauvages et 21% supérieur à celui des animaux *Gdf8*^{-/-}, et que leur taux de lactate était également significativement plus élevé que celui de ces deux populations.

La mutation causale responsable du phénotype des animaux GMA06 (décrit dans la figure 24) a été localisée par cartographie avec 60 marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble du génome et polymorphes entre les lignées murines FVB et C57BL/6J. La zone d'intérêt a ensuite été affinée grâce au séquençage de SNP (single nucleotide polymorphism) (également polymorphes entre FVB et C57BL/6J). Ceci nous a permis de localiser cette mutation dans une région de 8Mb située sur le chromosome 13. Cette région comporte 57 gènes et ne nous permet pas d'utiliser une approche candidat. Aucun des gènes présents n'est en effet connu pour intervenir dans le développement musculaire. De plus, le séquençage de SNP n'a pas permis de réduire suffisamment la zone, nous avons donc entrepris le séquençage complet de la région par la technologie de séquençage de nouvelle génération HiSeqTM 2000 (illumina). Les résultats sont en cours d'acquisition.

Taux de créatinine plasmatique



FVB (Wt)

GMA6+/-

Mstn -/-

Gdf8^{-/-}

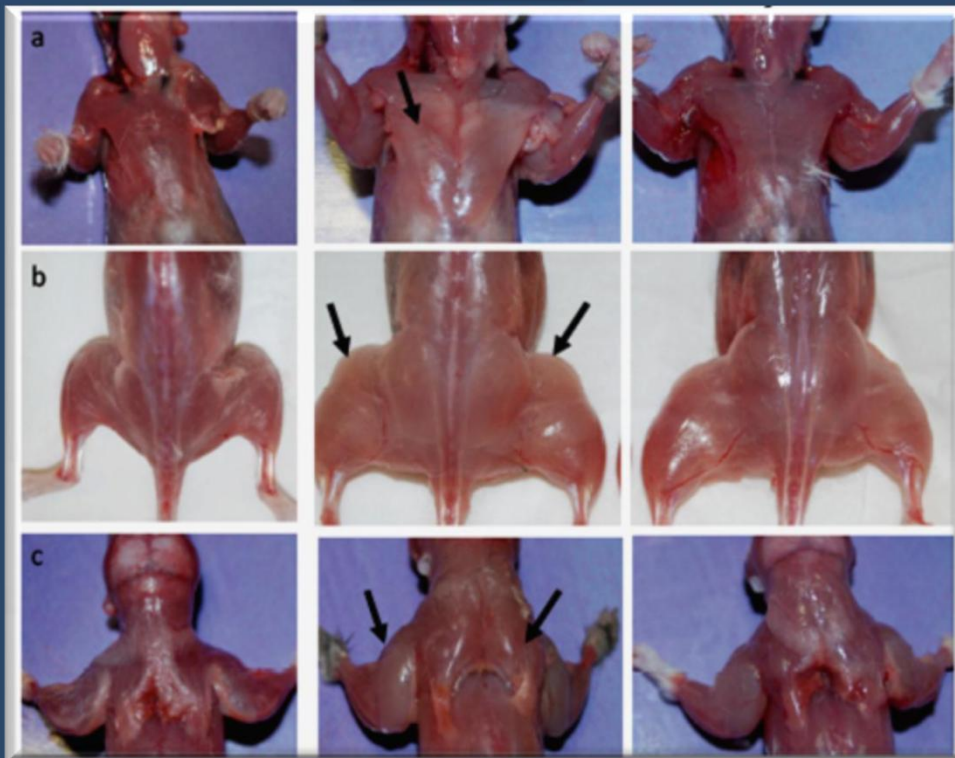


Figure 24 : phénotype des souris GMA06. (Magnol *et al.* 2010)

Publication 3 : A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome: study of muscle characteristics

Magnol L., Monestier O, Vuillier-Devillers K., Wagner S., Cocquempot O., Chevallier M.C. and Blanquet V

Animal, 5(05):663-671(2011)

Discussion générale

Durant ce travail de thèse, nous avons développé et caractérisé deux modèles murins afin d'étudier l'implication de nouveaux gènes dans le développement musculaire. Les applications à moyen et long terme sont de transposer ces résultats aux bovins et aux autres animaux d'élevage pour offrir d'éventuels candidats pouvant expliquer certains phénotypes d'hypermusculature mais également d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans les cas de maladies musculaires.

Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur l'étude du gène *Gasp1*, identifié en 2003 comme inhibiteur de la myostatine *in vitro*. Aucune donnée sur son action *in vivo* n'avait été publiée. En surexprimant de façon ubiquitaire *Gasp1* chez la souris, nous apportons ici la preuve que *Gasp1* agit bien sur le muscle en entraînant une augmentation de la masse musculaire. L'hypermusculature observée est due à une augmentation de la taille des fibres de types I, IIa et IIb mais avec aucune modification de la proportion de chaque type de fibres ni du nombre de fibres totales. L'absence d'hyperplasie semble cohérente avec le fait que le phénotype n'apparaisse que pendant la croissance postnatale de l'animal.

Nos animaux présentent une augmentation du nombre de globules rouges mais aucune modification du taux de graisse corporelle. Ces éléments diffèrent des observations faites sur les animaux *Gdf8*^{-/-} (McPherron et Lee 2001, Magnol *et al.* 2010), ce qui semble indiquer que l'action de *Gasp1* sur le muscle implique d'autres voies que celle de la myostatine. Des études *in vitro* actuellement en cours au laboratoire, notamment sur des cultures primaires issues de quadriceps de souris sur *Gasp1* et *Gdf8*^{-/-} et des cellules myoblastiques de rat (L6E9), semblent confirmer cette hypothèse. Pour avoir une première réponse « *in vivo* », des croisements entre des souris sur *Gasp1* et des souris déficientes pour la myostatine sont en cours. Nous nous attendons à observer :

- soit un phénotype hypermusclé plus prononcé que celui des souris *Gdf8*^{-/-} comme l'a rapporté Lee en 2007 lors de croisements entre des animaux surexprimant la follistatine ou FLRG et des animaux KO pour la myostatine, ce qui indiquerait que GASP1 peut agir indépendamment de GDF8.
- soit un phénotype identique à celui des animaux *Gdf8*^{-/-}, ce qui suggérerait que le phénotype hypermusclé observé dans les lignées sur *Gasp1* serait seulement dû à l'inhibition de GDF8 par GASP1

Pour évaluer les conséquences de la surexpression de *Gasp1* sur différentes voies de signalisation (AKT, IGF, MAPK,...), une étude du transcriptome et du protéome musculaires des lignées surGasp1 est en cours. Actuellement, nous ne disposons de données d'expression que de 91 gènes impliqués dans le développement musculaire, nous allons donc élargir cette étude à un panel de gènes plus important. Les résultats obtenus nous permettront de savoir si la surexpression de *Gasp1* induit des modifications dans les expressions géniques et protéiques similaires à celles observées chez les souris *Gdf8^{-/-}*, à savoir une surexpression des gènes impliqués dans la voie WNT canonique ainsi que des protéines impliquées dans le métabolisme glycolytique et des facteurs de survie cellulaire/anti apoptotique (Steelman *et al.* 2006, Chelh *et al.* 2009).

Seul le muscle de nos animaux mutants semble être affecté par la surexpression de *Gasp1*. Cette observation mérite d'être nuancée car les analyses réalisées sur les autres organes (cerveau, foie, cœur, rein) sont « grossières ». Des analyses immunohistochimiques détaillées d'organes dans lesquels *Gasp1* est notablement déjà exprimé chez les animaux sauvages, comme le cœur ou le cerveau, permettrait d'avoir une idée plus précise des effets de GASP1 sur l'état de ces derniers. Si cette analyse confirme que le phénotype des animaux surGasp1 est uniquement musculaire, il paraîtra intéressant d'envisager un rôle thérapeutique pour GASP1, d'autant plus que l'étude menée par Rodino-Klapac *et al.* (2009) (Figure 19) montre que l'augmentation de la masse musculaire due à la surexpression de *Gasp1* spécifiquement dans le muscle, bien qu'inférieure à celle observée lors de la surexpression de la follistatine, est supérieure à celle obtenue en surexprimant *Fstl3*.

Notre étude phylogénétique a permis d'éclaircir l'évolution de GASP1 qui était jusque-là inconnue. Nous avons pu montrer que *Gasp* pourrait être formé par la fusion de deux gènes retrouvés chez une anémone de mer et que la séparation entre *Gasp1* et *Gasp2* a eu lieu lors du premier « round » de duplication. La quasi-totalité des résultats de cette étude est en accord avec la littérature. Nous avons montré que le domaine follistatine était très conservé, ce qui est en accord avec les résultats de Kondas *et al.* (2008) qui montrent que ce domaine permet l'interaction de GASP1 avec GDF8 et GDF11. Nous montrons également une très bonne conservation du domaine nétrine à partir de la séparation de *Gasp1* et *Gasp2*, renforçant l'idée que ce domaine soit impliqué dans la liaison avec le propeptide de la myostatine. Un des points importants de cette étude concerne la grande conservation du second domaine kunitz. Nagy *et al.* (2003) ont montré que ce domaine possédait une activité anti-

trypsine, ce qui n'est pas le cas de l'autre domaine kunitz. Il s'agit donc actuellement du seul domaine antiprotéase de GASP1 dont nous savons qu'il est réellement actif. Or, plusieurs questions restent en suspens. Pourquoi ce domaine a-t-il subi une si grande pression de sélection alors qu'il ne semble pas impliqué dans l'action de la protéine ? Quel est le rôle de cette activité antiprotéase ? La trypsine est-elle réellement la cible de ce domaine kunitz ?

Pour répondre à ces questions, nous proposons un modèle de structure en trois dimensions de GASP1 : GASP1 aurait une forme d'épingle à cheveux dans lequel le domaine IgC2 se situe près de la boucle. Une des deux branches comporterait les domaines WAP, follistatine et kazal et pourrait se lier à GDF8, et l'autre branche comporterait les domaines kunitz et nétrine et se lierait au propeptide. Les domaines WAP, follistatine, kazal et NTR semblent jouer un rôle dans les interactions de GASP1 mais pas le second domaine kunitz qui possède une activité anti-trypsine. Nous proposons donc que GASP1 peut se fixer à la myostatine et au complexe latent les protégeant d'une éventuelle dégradation par la trypsine, ceci empêchant également la fixation de la myostatine au récepteur ActRIIB.

La démonstration de l'action de *Gasp1 in vivo* est importante. Elle permet d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques pour les maladies musculaires, les effets sur les autres organes semblant inexistant, ce qui est certainement lié au fait que cette protéine ne puisse se lier qu'à GDF8 et GDF11 et ne touche pas l'activine. De plus, les travaux de Rodino-Klapac *et al.* montrent l'effet bénéfique sur la masse musculaire de *Gasp1* sur des souris âgées.

A plus court terme, *Gasp1* a un intérêt agronomique important. En effet, nous montrons que la surexpression de *Gasp1* entraîne une amélioration de la masse musculaire sans influencer sur le taux de masse grasseuse. Ceci permettrait donc de sélectionner des animaux présentant une bonne conformation de carcasse liée à de bonnes qualités organoleptiques de la viande. Plusieurs projets de génotypage à grande échelle chez le bovin ont vu le jour ces dernières années. Parmi eux, le projet Qualvigène constitue une base de données comprenant l'ADN de nombreux animaux dont la conformation de carcasse et les qualités de viande obtenues après abattage sont connues. La mise en relation des éventuels polymorphismes présents dans le gène *Gasp1* avec ces caractères pourra mettre en évidence un rôle de *Gasp1* applicable pour la sélection génétique des animaux d'élevages.

En ce qui concerne les souris GMA06, la mutation est située dans une zone du génome où peu de gènes sont décrits comme étant importants dans le développement musculaire

murin ou bovin. Le gène de la follistatine se situe sur le même chromosome mais à l'extérieur de notre zone d'intérêt, ce qui n'en faisait pas un gène candidat. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure le fait que notre mutation causale ait un effet sur l'expression de *Fst*. La *Map3k1*, quant à elle, se situe également dans cette région mais le séquençage complet de ce gène sur plusieurs animaux GMA06 n'a pas révélé de mutation. Le séquençage de la région du chromosome 13 où se situe la mutation causale du phénotype GMA06 a été entrepris par la méthode HiSeqTM 2000. Trois cas de figure peuvent se présenter quant à sa localisation :

- soit elle se situe dans un gène connu pour avoir un effet sur le développement musculaire, et constituera ou non un nouvel allèle.
- soit elle se situe dans un gène qui n'avait pas d'action décrite dans le muscle et pour lequel nous montrerons une nouvelle fonction.
- soit elle se situe dans un gène n'ayant pas encore de fonction décrite.

Les résultats de séquençage sont actuellement en cours d'acquisition et nous permettront de définitivement trancher. De plus, la population GMA06 a été revivifiée récemment et le phénotype va pouvoir être décrit plus précisément. Il sera particulièrement intéressant de le comparer à celui des lignées *Gdf8*^{-/-} ou *surGaspl*.

Bibliographie

- Abellan van Kan G, Andre E, Bischoff Ferrari HA, Boirie Y, Onder G, Pahor M, Ritz P, Rolland Y, Sampaio C, Studenski S *et al*: **Carla Task Force on Sarcopenia: propositions for clinical trials**. *The journal of nutrition, health & aging* 2009, **13**(8):700-707.
- Agbulut O, Noirez P, Beaumont F, Butler-Browne G: **Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice**. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2003, **95**(6):399-406.
- Alexander LJ, Kuehn LA, Smith TP, Matukumalli LK, Mote B, Koltjes JE, Reecy J, Geary TW, Rule DC, Macneil MD: **A Limousin specific myostatin allele affects longissimus muscle area and fatty acid profiles in a Wagyu-Limousin F2 population**. *Journal of animal science* 2009, **87**(5):1576-1581.
- Allais S, Leveziel H, Payet-Duprat N, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, Denoyelle C, Bernard-Capel C, Journaux L, Bonnot A *et al*: **The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds**. *Journal of animal science* 2010, **88**(2):446-454.
- Allen DL, Loh AS: **Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle**. *American journal of physiology Cell physiology* 2011, **300**(1):C124-137.
- Al-Qusairi L, Laporte J: **T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases**. *Skeletal muscle* 2011, **1**(1):26.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D: **Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle**. *Endocrinology* 2009, **150**(1):286-294.
- Amthor H, Connolly D, Patel K, Brand-Saberi B, Wilkinson DG, Cooke J, Christ B: **The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis**. *Developmental biology* 1996, **178**(2):343-362.
- Amthor H, Christ B, Rashid-Doubell F, Kemp CF, Lang E, Patel K: **Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth**. *Developmental biology* 2002a, **243**(1):115-127.
- Amthor H, Huang R, McKinnell I, Christ B, Kambadur R, Sharma M, Patel K: **The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis**. *Developmental biology* 2002b, **251**(2):241-257.
- Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, Patel K: **Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis**. *Developmental biology* 2004, **270**(1):19-30.
- Aoki MS, Soares AG, Miyabara EH, Baptista IL, Moriscot AS: **Expression of genes related to myostatin signaling during rat skeletal muscle longitudinal growth**. *Muscle & nerve* 2009, **40**(6):992-999.
- Arnold JS, Werling U, Braunstein EM, Liao J, Nowotschin S, Edelmann W, Hebert JM, Morrow BE: **Inactivation of Tbx1 in the pharyngeal endoderm results in 22q11DS malformations**. *Development* 2006, **133**(5):977-987.
- Arthur PF, Makarechian M, Salmon RK, Price MA: **Plasma growth hormone and insulin concentrations in double-muscled and normal bull calves**. *Journal of animal science* 1990, **68**(6):1609-1615.
- Bailey AJ, Enser MB, Dransfield E, Restall DJ, Avery NC: **Muscle and adipose tissue from normal and double muscled cattle: collagen types, muscle fiber diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties. Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production**. *King J.W.B., Ménéssier F. (Eds). Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Martinus Nijhoff, The Netherlands* 1982, **16**:178-204.
- Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P, Buckingham ME: **A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb**. *Genes & development* 2006, **20**(17):2450-2464.
- Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ, Lindeman RD: **Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico**. *American journal of epidemiology* 1998, **147**(8):755-763.
- Bell ML, Buvoli M, Leinwand LA: **Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping**. *Molecular and cellular biology* 2010, **30**(8):1937-1945.
- Bemben MG: **Age-related physiological alterations to muscles and joints and potential exercise interventions for their improvement**. *The Journal of the Oklahoma State Medical Association* 1999, **92**(1):13-20.
- Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA: **Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia**. *Biochemical and biophysical research communications* 2010, **391**(3):1548-1554.

- Berkes CA, Tapscott SJ: **MyoD and the transcriptional control of myogenesis.** *Seminars in cell & developmental biology* 2005, **16**(4-5):585-595.
- Bernardi H, Gay S, Fedon Y, Vernus B, Bonniou A, Bacou F: **Wnt4 activates the canonical beta-catenin pathway and regulates negatively myostatin: functional implication in myogenesis.** *American journal of physiology Cell physiology* 2011, **300**(5):C1122-1138.
- Biral D, Betto R, Danieli-Betto D, Salviati G: **Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle.** *The Biochemical journal* 1988, **250**(1):307-308.
- Biressi S, Molinaro M, Cossu G: **Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development.** *Developmental biology* 2007, **308**(2):281-293.
- Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S, Reggiani C: **Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation.** *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009, **23**(11):3896-3905.
- Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS: **Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade.** *Nature* 2002, **420**(6914):418-421.
- Boldrin L, Muntoni F, Morgan JE: **Are human and mouse satellite cells really the same?** *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2010, **58**(11):941-955.
- Borello U, Berarducci B, Murphy P, Bajard L, Buffa V, Piccolo S, Buckingham M, Cossu G: **The Wnt/beta-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis.** *Development* 2006, **133**(18):3723-3732.
- Borycki AG, Brunk B, Tajbakhsh S, Buckingham M, Chiang C, Emerson CP, Jr.: **Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation.** *Development* 1999, **126**(18):4053-4063.
- Bothe I, Dietrich S: **The molecular setup of the avian head mesoderm and its implication for craniofacial myogenesis.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2006, **235**(10):2845-2860.
- Bothe I, Ahmed MU, Winterbottom FL, von Scheven G, Dietrich S: **Extrinsic versus intrinsic cues in avian paraxial mesoderm patterning and differentiation.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2007, **236**(9):2397-2409.
- Bouisset S, and Maton B: **Muscles, posture et mouvement : Bases et applications de la méthode électromyographique,** Hermann Ed, Paris, 1995.
- Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, Black DL: **MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development.** *Genes & development* 2007, **21**(1):71-84.
- Braun T, Gautel M: **Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2011, **12**(6):349-361.
- Brooke MH, Kaiser KK: **Muscle fiber types: how many and what kind?** *Archives of neurology* 1970, **23**(4):369-379.
- Brown SD, Nolan PM: **Mouse mutagenesis-systematic studies of mammalian gene function.** *Human molecular genetics* 1998, **7**(10):1627-1633.
- Brunelli S, Relaix F, Baesso S, Buckingham M, Cossu G: **Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity.** *Developmental biology* 2007, **304**(2):604-614.
- Buckingham M: **Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates.** *Current opinion in genetics & development* 2006, **16**(5):525-532.
- Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J et al.: **MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice.** *The Journal of clinical investigation* 2009, **119**(9):2772-2786.
- Carnac G, Ricaud S, Vernus B, Bonniou A: **Myostatin: biology and clinical relevance.** *Mini reviews in medicinal chemistry* 2006, **6**(7):765-770.
- Carnac G, Vernus B, Bonniou A: **Myostatin in the pathophysiology of skeletal muscle.** *Current genomics* 2007, **8**(7):415-422.
- Cash JN, Rejon CA, McPherron AC, Bernard DJ, Thompson TB: **The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding.** *The EMBO journal* 2009, **28**(17):2662-2676.
- Cash JN, Angerman EB, Kattamuri C, Nolan K, Zhao H, Sidis Y, Keutmann HT, Thompson TB: **The structure of myostatin:follistatin-like 3: N-terminal domains of follistatin-type molecules exhibit alternate modes of binding.** *The Journal of biological chemistry* 2011.
- Chakkalakal JV, Nishimune H, Ruas JL, Spiegelman BM, Sanes JR: **Retrograde influence of muscle fibers on their innervation revealed by a novel marker for slow motoneurons.** *Development* 2010, **137**(20):3489-3499.

- Chambon C, Duteil D, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Malivindi R, Kato S, Chambon P, Metzger D: **Myocytic androgen receptor controls the strength but not the mass of limb muscles.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(32):14327-14332.
- Charlier C, Coppieters W, Farnir F, Grobet L, Leroy PL, Michaux C, Mni M, Schwers A, Vanmanshoven P, Hanset R *et al.*: **The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2.** *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 1995, **6**(11):788-792.
- Chelh I, Meunier B, Picard B, Reecy MJ, Chevalier C, Hocquette JF, Cassar-Malek I: **Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets.** *BMC genomics* 2009, **10**:196.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ: **The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.** *Nature genetics* 2006, **38**(2):228-233.
- Chen Y, Ye J, Cao L, Zhang Y, Xia W, Zhu D: **Myostatin regulates glucose metabolism via the AMP-activated protein kinase pathway in skeletal muscle cells.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010, **42**(12):2072-2081.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA: **Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function.** *Nature* 1996, **383**(6599):407-413.
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS: **A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type.** *Genes & development* 1998, **12**(16):2499-2509.
- Clinquart A, Hornick JL, Van Eenaeme C, Istasse L : **Le caractère culard en Blanc Bleu Belge.** *INRA Prod Anim* 1998, **11** : 285-297.
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F *et al.*: **A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep.** *Nature genetics* 2006, **38**(7):813-818.
- Coghill EL, Hugill A, Parkinson N, Davison C, Glenister P, Clements S, Hunter J, Cox RD, Brown SD: **A gene-driven approach to the identification of ENU mutants in the mouse.** *Nature genetics* 2002, **30**(3):255-256.
- Craig R, Padron R: Chapter 7 **Molecular Structure of the Sarcomere.** In *Myology*. 3rd edition. The McGraw-HillCompanies, Inc; 2004:129-166.
- Cruz-Jentoft AJ, Landi F, Topinkova E, Michel JP: **Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome.** *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2010, **13**(1):1-7.
- Culley G: **Observations in Livestock.** *G. Woodfall, London 1807.*
- Dastjerdi A, Robson L, Walker R, Hadley J, Zhang Z, Rodriguez-Niedenfuhr M, Ataliotis P, Baldini A, Scambler P, Francis-West P: **Tbx1 regulation of myogenic differentiation in the limb and cranial mesoderm.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2007, **236**(2):353-363.
- Daston G, Lamar E, Olivier M, Goulding M: **Pax-3 is necessary for migration but not differentiation of limb muscle precursors in the mouse.** *Development* 1996, **122**(3):1017-1027.
- De Winter JP, ten Dijke P, de Vries CJ, van Achterberg TA, Sugino H, de Waele P, Huylebroeck D, Verschueren K, van den Eijnden-van Raaij AJ: **Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors.** *Molecular and cellular endocrinology* 1996, **116**(1):105-114.
- D'Erchia AM, Gissi C, Pesole G, Saccone C, Arnason U: **The guinea-pig is not a rodent.** *Nature* 1996, **381**(6583):597-600.
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ: **Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization.** *Genes & development* 1998, **12**(22):3499-3511.
- Doherty TJ: **Invited review: Aging and sarcopenia.** *J Appl Physiol* 2003, **95**(4):1717-1727.
- Dong F, Sun X, Liu W, Ai D, Klysik E, Lu MF, Hadley J, Antoni L, Chen L, Baldini A *et al.*: **Pitx2 promotes development of splanchnic mesoderm-derived branchiomeric muscle.** *Development* 2006, **133**(24):4891-4899.
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z *et al.*: **A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish.** *Development* 1996, **123**:37-46.
- Drummond MJ, Glynn EL, Fry CS, Dhanani S, Volpi E, Rasmussen BB: **Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle.** *The Journal of nutrition* 2009, **139**(12):2279-2284.

- Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MV, Peterson KL, Indolfi C, Catalucci D, Chen J *et al.*: **The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease.** *Cell death and differentiation* 2009, **16**(12):1590-1598.
- Engel WK: **The essentiality of histochemical and crytochemical studies of skeletal muscle, in the investigation of neuro-muscular disease** *Neurology* 1962, **12**: 778-784.
- Esmailizadeh AK, Bottema CD, Sellick GS, Verbyla AP, Morris CA, Cullen NG, Pitchford WS: **Effects of the myostatin F94L substitution on beef traits.** *Journal of animal science* 2008, **86**(5):1038-1046.
- Evans W: **Functional and metabolic consequences of sarcopenia.** *The Journal of nutrition* 1997, **127**(5 Suppl):998S-1003S.
- Fainsod A, Deissler K, Yelin R, Marom K, Epstein M, Pillemer G, Steinbeisser H, Blum M: **The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4.** *Mechanisms of development* 1997, **63**(1):39-50.
- Fauteck SP, Kandarian SC: **Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions.** *The American journal of physiology* 1995, **268**(2 Pt 1):C419-424.
- Friend JB: **Cattle of the world.** Poole, [Eng]: Blandford Press; 1978.
- Gagniere H, Picard B, Jurie C, Geay Y: **Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-muscled cattle.** *Meat science* 1997, **45**(2):145-152.
- Galler S, Schmitt TL, Pette D: **Stretch activation, unloaded shortening velocity, and myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscle fibres.** *The Journal of physiology* 1994, **478 Pt 3**:513-521.
- Gamer LW, Wolfman NM, Celeste AJ, Hattersley G, Hewick R, Rosen V: **A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in *Xenopus* embryos.** *Developmental biology* 1999, **208**(1):222-232.
- Gans M, Audit C, Masson M: **Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 1975, **81**(4):683-704.
- Gilbert SF: **Developmental Biology**, 6th edition *Scott F Swarthmore College Sunderland (MA)*: Sinauer Associates; 2000.
- Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP: **Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2009, **297**(1):E157-164.
- Giordani J, Bajard L, Demignon J, Daubas P, Buckingham M, Maire P: **Six proteins regulate the activation of Myf5 expression in embryonic mouse limbs.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, **104**(27):11310-11315.
- Glass D, Roubenoff R: **Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010, **1211**:25-36.
- Golden MH: **Evolution of nutritional management of acute malnutrition.** *Indian pediatrics* 2010, **47**(8):667-678.
- Goldspink G: **Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload.** *Journal of anatomy* 1999, **194 (Pt 3)**:323-334.
- Graur D, Hide WA, Li WH: **Is the guinea-pig a rodent?** *Nature* 1991, **351**(6328):649-652.
- Grifone R, Laclef C, Spitz F, Lopez S, Demignon J, Guidotti JE, Kawakami K, Xu PX, Kelly R, Petrof BJ *et al.*: **Six1 and Eya1 expression can reprogram adult muscle from the slow-twitch phenotype into the fast-twitch phenotype.** *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(14):6253-6267.
- Grifone R, Demignon J, Houbron C, Souil E, Niro C, Seller MJ, Hamard G, Maire P: **Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo.** *Development* 2005, **132**(9):2235-2249.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J *et al.*: **A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle.** *Nature genetics* 1997, **17**(1):71-74.
- Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Menissier F, Zanotti M, Dunner S, Georges M: **Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle.** *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 1998, **9**(3):210-213.
- Gros J, Manceau M, Thome V, Marcelle C: **A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells.** *Nature* 2005, **435**(7044):954-958.
- Groves JA, Hammond CL, Hughes SM: **Fgf8 drives myogenic progression of a novel lateral fast muscle fibre population in zebrafish.** *Development* 2005, **132**(19):4211-4222.
- Guo J, Jou W, Gavrilova O, Hall KD: **Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesigenic diets.** *PloS one* 2009, **4**(4):e5370.

- Hacker A, Guthrie S: **A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo.** *Development* 1998, **125**(17):3461-3472.
- Hadjipavlou G, Matika O, Clop A, Bishop SC: **Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep.** *Animal genetics* 2008, **39**(4):346-353.
- Hanset R & Michaux C: **Creatine and creatinine levels in plasma red cells and muscles as characteristics of double-muscle cattle.** In: *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its Use to Improve Beef Production* (Ed. by J.W.B. King & F. Menissier), 1982 pp. 237–56. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.
- Hanset R, Michaux C: **On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed.** *Experimental-Data Genet Sel Evol* 1985, **17**: 359- 368.
- Hanset R: **Breeding for disease resistance in farm animals.** pp. 467–78 In: *CAB International Ed. by J. B. Owen & R. F. E. Axfor.*, Axford, Wallingford, UK, 1991.
- Harrison BC, Allen DL, Leinwand LA: **I1b or not I1b? Regulation of myosin heavy chain gene expression in mice and men.** *Skeletal muscle* 2011, **1**(1):5.
- Hayette S, Gadoux M, Martel S, Bertrand S, Tigaud I, Magaud JP, Rimokh R: **FLRG (follistatin-related gene), a new target of chromosomal rearrangement in malignant blood disorders.** *Oncogene* 1998, **16**(22):2949-2954.
- Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, Qiu Y: **The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(43):40735-40741.
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM: **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* 2003, **17**(6):1144-1154.
- Hitotsumachi S, Carpenter DA, Russell WL: **Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985, **82**(19):6619-6621.
- Hocquette JF, Bas P, Bauchart D, Vermorel M, Geay Y: **Fat partitioning and biochemical characteristics of fatty tissues in relation to plasma metabolites and hormones in normal and double-muscle young growing bulls.** *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 1999, **122**(1):127-138.
- Holmes JH, Ashmore CR, Robinson DW: **Effects of stress on cattle with hereditary muscular hypertrophy.** *Journal of animal science* 1973, **36**(4):684-694.
- Hoshiba T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G: **Development of stepwise osteogenesis-mimicking matrices for the regulation of mesenchymal stem cell functions.** *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(45):31164-31173.
- Hrabe de Angelis M, Balling R: **Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics.** *Mutation research* 1998, **400**(1-2):25-32.
- Hrabe de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M *et al.*: **Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis.** *Nature genetics* 2000, **25**(4):444-447.
- Huang Z, Chen D, Zhang K, Yu B, Chen X, Meng J: **Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells.** *Cellular signalling* 2007, **19**(11):2286-2295.
- Huang Z, Chen X, Chen D: **Myostatin: a novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation.** *Cellular signalling* 2011, **23**(9):1441-1446.
- Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs AM: **MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents.** *Mechanisms of development* 1997, **61**(1-2):151-163.
- Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM, Kenny AM: **Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women.** *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2002, **57**(12):M772-777.
- Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, Sugino H, Ueno N: **Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(16):9337-9342.
- Inouye S, Ling N, Shimasaki S: **Localization of the heparin binding site of follistatin.** *Molecular and cellular endocrinology* 1992, **90**(1):1-6.
- Jiang XY, Sun CF, Zhang QG, Zou SM: **ENU-Induced Mutagenesis in Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by Treating Mature Sperm.** *PloS one* 2011, **6**(10):e26475.

- Johnson PL, McEwan JC, Dodds KG, Purchas RW, Blair HT: **Meat quality traits were unaffected by a quantitative trait locus affecting leg composition traits in Texel sheep.** *Journal of animal science* 2005, **83**(12):2729-2735.
- Jouliat D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G: **Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin.** *Experimental cell research* 2003, **286**(2):263-275.
- Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A: **Mouse ENU mutagenesis.** *Human molecular genetics* 1999, **8**(10):1955-1963.
- Kaiser : **Über die sogenannten doppelendigen.** *Rinderrassenerhebung Landwirtschaftliche Jahrbuch* 1888, **17**: 387-403.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ: **Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle.** *Genome research* 1997, **7**(9):910-916.
- Kasahara M: **The 2R hypothesis: an update.** *Current opinion in immunology* 2007, **19**(5):547-552.
- Kassar-Duchossoy L, Giaccone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S: **Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development.** *Genes & development* 2005, **19**(12):1426-1431.
- Kelly RG, Jerome-Majewska LA, Papaioannou VE: **The del22q11.2 candidate gene Tbx1 regulates branchiomeric myogenesis.** *Human molecular genetics* 2004, **13**(22):2829-2840.
- Kemphues KJ, Priess JR, Morton DG, Cheng NS: **Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C. elegans embryos.** *Cell* 1988, **52**(3):311-320.
- Keutmann HT, Schneyer AL, Sidis Y: **The role of follistatin domains in follistatin biological action.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**(1):228-240.
- Kondas K, Szlama G, Trexler M, Patthy L: **Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for growth and differentiation factors 8 and 11.** *The Journal of biological chemistry* 2008, **283**(35):23677-23684.
- Kronacher C: **Genetik und Tierzuchtung. In: Handbuch der Vererbungswissenschaft.** Ed. by E. Baur & M. Hartmann 1934, **3**:139. *Gerbrüder Borntraeger, Berlin.*
- Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R: **Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression.** *The Journal of biological chemistry* 2002, **277**(51):49831-49840.
- Laurentino GC, Ugrinowitsch C, Roschel H, Aoki MS, Soares AG, Neves M, Jr., Aihara AY, da Rocha Correa Fernandes A, Tricoli V: **Strength Training with Blood Flow Restriction Diminishes Myostatin Gene Expression.** *Medicine and science in sports and exercise* 2011.
- Lee SJ, McPherron AC: **Regulation of myostatin activity and muscle growth.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(16):9306-9311.
- Lee SJ, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J *et al.*: **Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(50):18117-18122.
- Lee SJ: **Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways.** *PloS one* 2007, **2**(8):e789.
- Lee SJ: **Genetic analysis of the role of proteolysis in the activation of latent myostatin.** *PloS one* 2008, **3**(2):e1628.
- Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, Soleimani A, Matzuk MM, Tsuchida K, Cohn RD, Barton ER: **Regulation of muscle mass by follistatin and activins.** *Mol Endocrinol* 2010, **24**(10):1998-2008.
- Lee SJ: **Extracellular Regulation of Myostatin: A Molecular Rheostat for Muscle Mass.** *Immunology, endocrine & metabolic agents in medicinal chemistry* 2010, **10**:183-194.
- Lepper C, Conway SJ, Fan CM: **Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements.** *Nature* 2009, **460**(7255):627-631.
- Lepper C, Partridge TA, Fan CM: **An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration.** *Development* 2011, **138**(17):3639-3646.
- Lexell J, Taylor CC, Sjöström M: **What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men.** *Journal of the neurological sciences* 1988, **84**(2-3):275-294.
- Lexell J, Downham D: **What determines the muscle cross-sectional area?** *Journal of the neurological sciences* 1992, **111**(1):113-114.
- Lexell J: **Evidence for nervous system degeneration with advancing age.** *The Journal of nutrition* 1997, **127**(5 Suppl):1011S-1013S.
- Lexell J: **Human aging, muscle mass, and fiber type composition.** *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 1995, **50** Spec No:11-16.

- Lin J, Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA: **Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis.** *Biochemical and biophysical research communications* 2002, **291**(3):701-706.
- Lines DS, Pitchford WS, Kruk ZA, Bottema CD: **Limousin myostatin F94L variant affects semitendinosus tenderness.** *Meat science* 2009, **81**(1):126-131.
- Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R, Sun LQ: **Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice.** *Cancer gene therapy* 2007, **14**(12):945-952.
- Lu J, Webb R, Richardson JA, Olson EN: **MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(2):552-557.
- Lu JR, Bassel-Duby R, Hawkins A, Chang P, Valdez R, Wu H, Gan L, Shelton JM, Richardson JA, Olson EN: **Control of facial muscle development by MyoR and capsulin.** *Science* 2002, **298**(5602):2378-2381.
- Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S: **Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2001, **281**(6):E1128-1136.
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B: **Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2003, **285**(2):E363-371.
- Madsen O, Scally M, Douady CJ, Kao DJ, DeBry RW, Adkins R, Amrine HM, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS: **Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals.** *Nature* 2001, **409**(6820):610-614.
- Makanji Y, Walton KL, Chan KL, Gregorevic P, Robertson DM, Harrison CA: **Generation of a specific activin antagonist by modification of the activin A propeptide.** *Endocrinology* 2011, **152**(10):3758-3768.
- Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P: **Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-/- mutant mice.** *Development* 1996, **122**(3):831-838.
- Maroto M, Reshef R, Munsterberg AE, Koester S, Goulding M, Lassar AB: **Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue.** *Cell* 1997, **89**(1):139-148.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Su JG, Hsueh AJ, Bradley A: **Alpha-inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice.** *Nature* 1992, **360**(6402):313-319.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A: **Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(19):8817-8821.
- Matzuk MM, Lu N, Vogel H, Sellheyer K, Roop DR, Bradley A: **Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin.** *Nature* 1995, **374**(6520):360-363.
- Mauro A: **Satellite cell of skeletal muscle fibers.** *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 1961, **9**:493-495.
- Mayer M: **Molecular neurobiology. NMDA receptors cloned at last.** *Nature* 1991, **354**(6348):16-17.
- McKinnell IW, Ishibashi J, Le Grand F, Punch VG, Addicks GC, Greenblatt JF, Dilworth FJ, Rudnicki MA: **Pax7 activates myogenic genes by recruitment of a histone methyltransferase complex.** *Nature cell biology* 2008, **10**(1):77-84.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ: **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.** *Nature* 1997, **387**(6628):83-90.
- McPherron AC, Lee SJ: **Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(23):12457-12461.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ: **Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11.** *Nature genetics* 1999, **22**(3):260-264.
- McPherron AC, Lee SJ: **Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice.** *The Journal of clinical investigation* 2002, **109**(5):595-601.
- Menissier F., 1982a. **General survey of the effect of double muscling on cattle performance. In: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production.** King J.W.B., Ménessier F. (Eds). *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, Martinus Nijhoff, The Netherlands, **16**, 21-53.
- Menissier F., 1982b. **Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. In: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production.** King J.W.B., Ménessier F. (Eds). *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, Martinus Nijhoff, The Netherlands, **16**, 387-428
- Michaux C, van Sichem-Reynaert CR *et al.* : **Endocrinological studies on double muscled cattle: LH, GH, testosterone and insulin plasma levels during the first year of life. In: Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its Use to Improve Beef Production.** Ed. by J.W.B. King & F. Menissier. 1982, pp. 350-67. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague.

- Milan G, Dalla Nora E, Pilon C, Pagano C, Granzotto M, Manco M, Mingrone G, Vettor R: **Changes in muscle myostatin expression in obese subjects after weight loss.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004, **89**(6):2724-2727.
- Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A, Hennebry A, Berry CJ, Sharma M, Kambadur R, Nishimura T: **Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **340**(2):675-680.
- Mootoosamy RC, Dietrich S: **Distinct regulatory cascades for head and trunk myogenesis.** *Development* 2002, **129**(3):573-583.
- Morine KJ, Bish LT, Pendrak K, Sleeper MM, Barton ER, Sweeney HL: **Systemic myostatin inhibition via liver-targeted gene transfer in normal and dystrophic mice.** *PloS one* 2010, **5**(2):e9176.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA: **A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs.** *PLoS genetics* 2007, **3**(5):e79.
- Munsterberg AE, Kitajewski J, Bumcrot DA, McMahon AP, Lassar AB: **Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite.** *Genes & development* 1995, **9**(23):2911-2922.
- Murphy KT, Chee A, Gleeson BG, Naim T, Swiderski K, Koopman R, Lynch GS: **Antibody-directed myostatin inhibition enhances muscle mass and function in tumor-bearing mice.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2011, **301**(3):R716-726.
- Murphy WJ, Eizirik E, Johnson WE, Zhang YP, Ryder OA, O'Brien SJ: **Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals.** *Nature* 2001, **409**(6820):614-618.
- Nagy A, Trexler M, Patthy L: **Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKK protein.** *European journal of biochemistry / FEBS* 2003, **270**(9):2101-2107.
- Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K, Sugino H: **Activin-binding protein from rat ovary is follistatin.** *Science* 1990, **247**(4944):836-838.
- Nakatani M, Takehara Y, Sugino H, Matsumoto M, Hashimoto O, Hasegawa Y, Murakami T, Uezumi A, Takeda S, Noji S *et al*: **Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice.** *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008, **22**(2):477-487.
- Nicholas G, Thomas M, Langley B, Somers W, Patel K, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R: **Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin.** *Journal of cellular physiology* 2002, **193**(1):120-131.
- Nishida AT, Kobuke K, Kojima K, Ito J, Honjo T, Tashiro K: **OC29 is preferentially expressed in the presumptive sensory organ region of the otocyst.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2004, **231**(4):766-774.
- Nolan PM, Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J, Spurr N, Gray IC, Vizor L, Brooker D, Whitehill E *et al*.: **A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse.** *Nature genetics* 2000, **25**(4):440-443.
- Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ: **The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse.** *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 2000, **11**(7):478-483.
- O'Rourke, KS: **Sarcopenia and Myopathies in the Elderly.** *Geriatric Rheumatology* 2011, Part 3, 259-274, DOI: 10.1007/978-1-4419-5792-4_27
- Ohno S: **Evolution by gene duplication.** Berlin, New York,: Springer-Verlag; 1970.
- Panopoulou G, Poustka AJ: **Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications -- the adventure of a hypothesis.** *Trends in genetics : TIG* 2005, **21**(10):559-567.
- Park JJ, Berggren JR, Hulver MW, Houmard JA, Hoffman EP: **GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss-induced improvements in insulin action in human skeletal muscle.** *Physiological genomics* 2006, **27**(2):114-121.
- Perie S, Agbulut O, St Guily JL, Butler-Browne GS: **Myosin heavy chain expression in human laryngeal muscle fibers. A biochemical study.** *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* 2000, **109**(2):216-220.
- Pette D, Staron RS: **Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions.** *Microscopy research and technique* 2000, **50**(6):500-509.
- Philip B, Lu Z, Gao Y: **Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK.** *Cellular signalling* 2005, **17**(3):365-375.

- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP, Jr.: **Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos.** *Annual review of cell and developmental biology* 2002, **18**:747-783.
- Quesada SA & Cachafeiro BME **Reproduction de la femelle cularde en race Asturienne.** *22nd Reunion annuelle, Federation Europeenne de Zootechnie, Annales de Genetique et de Selection Animale* 1971, **4**:132.
- Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF: **Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(23):8721-8726.
- Rearidon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E: **Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy.** *Muscle & nerve* 2001, **24**(7):893-899.
- Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L: **Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis.** *Molecular and cellular biology* 2003, **23**(20):7230-7242.
- Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A, Buckingham M: **Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells.** *The Journal of cell biology* 2006, **172**(1):91-102.
- Reshef R, Maroto M, Lassar AB: **Regulation of dorsal somitic cell fates: BMPs and Noggin control the timing and pattern of myogenic regulator expression.** *Genes & development* 1998, **12**(3):290-303.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J: **Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis.** *Biochemical and biophysical research communications* 2001, **280**(2):561-566.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J: **Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation.** *American journal of physiology Cell physiology* 2002, **282**(5):C993-999.
- Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG, de Kretser DM: **The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin.** *Biochemical and biophysical research communications* 1987, **149**(2):744-749.
- Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK, Mendell JR: **Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease.** *Muscle & nerve* 2009, **39**(3):283-296.
- Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL: **Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979, **76**(11):5818-5819.
- Russell WL, Hunsicker PR, Raymer GD, Steele MH, Stelzner KF, Thompson HM: **Dose--response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, **79**(11):3589-3591.
- Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, Gayraud-Morel B, Guenou H, Malissen B, Tajbakhsh S, Galy A: **Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration.** *Development* 2011, **138**(17):3647-3656.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL: **Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy.** *Cell* 2004, **117**(3):399-412.
- Sandri M: **Signaling in muscle atrophy and hypertrophy.** *Physiology (Bethesda)* 2008, **23**:160-170.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM: **Growing roles for the mTOR pathway.** *Current opinion in cell biology* 2005, **17**(6):596-603.
- Saremi A, Gharakhanloo R, Sharghi S, Gharaati MR, Larijani B, Omidfar K: **Effects of oral creatine and resistance training on serum myostatin and GASP1.** *Molecular and cellular endocrinology* 2010, **317**(1-2):25-30.
- Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, Sandri M: **Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood.** *American journal of physiology Cell physiology* 2009, **296**(6):C1248-1257.
- Sato T, Rocancourt D, Marques L, Thorsteinsdottir S, Buckingham M: **A Pax3/Dmrt2/Myf5 regulatory cascade functions at the onset of myogenesis.** *PLoS genetics* 2010, **6**(4):e1000897.
- Schiaffino S, Reggiani C: **Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance.** *Physiological reviews* 1996, **76**(2):371-423.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ: **Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child.** *The New England journal of medicine* 2004, **350**(26):2682-2688.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA: **Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells.** *Cell* 2000, **102**(6):777-786.

- Shelton GD, Engvall E: **Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene.** *Neuromuscular disorders : NMD* 2007, **17**(9-10):721-722.
- Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K *et al.*: **Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle.** *Cell metabolism* 2011, **13**(2):170-182.
- Siriatt V, Platt L, Salerno MS, Ling N, Kambadur R, Sharma M: **Prolonged absence of myostatin reduces sarcopenia.** *Journal of cellular physiology* 2006, **209**(3):866-873.
- Small EM, O'Rourke JR, Moresi V, Sutherland LB, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN: **Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(9):4218-4223.
- Smet SD, Webb EC, Claeyss E, Uytterhaegen L, Demeyer DI: **Effect of dietary energy and protein levels on fatty acid composition of intramuscular fat in double-muscled Belgian Blue bulls.** *Meat science* 2000, **56**(1):73-79.
- Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martyn JK, Bass JJ, Sharma M: **The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD.** *Molecular and cellular biology* 2002, **22**(20):7066-7082.
- Staron RS: **Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in single human muscle fibers.** *Histochemistry* 1991, **96**(1):21-24.
- Staron RS, Johnson P: **Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle.** *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry* 1993, **106**(3):463-475.
- Staron RS, Pette D: **The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle.** *Histochemistry* 1993, **100**(2):149-153.
- Staron RS, Kraemer WJ, Hikida RS, Fry AC, Murray JD, Campos GE: **Fiber type composition of four hindlimb muscles of adult Fisher 344 rats.** *Histochemistry and cell biology* 1999, **111**(2):117-123.
- Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM: **Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy.** *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006, **20**(3):580-582.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ: **The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** *Molecular cell* 2004, **14**(3):395-403.
- Strath RA, Thompson JR *et al.*: **Reproduction in Cattle Displaying Muscular Hypertrophy, 60th Annual Feeders.** *Day Report. Department of Animal Science, University of Alberta, Canada* 1981.
- Sumitomo S, Inouye S, Liu XJ, Ling N, Shimasaki S: **The heparin binding site of follistatin is involved in its interaction with activin.** *Biochemical and biophysical research communications* 1995, **208**(1):1-9.
- Suryawan A, Frank JW, Nguyen HV, Davis TA: **Expression of the TGF-beta family of ligands is developmentally regulated in skeletal muscle of neonatal rats.** *Pediatric research* 2006, **59**(2):175-179.
- Swatland HJ & Kieffer NM: **Fetal development of the double muscled condition in cattle.** *Journal of Animal Science* 1974, **38**: 752-7.
- Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, Oustanina S, Braun T, Dalmay T, Munsterberg A: **Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133.** *Developmental biology* 2008, **321**(2):491-499.
- Szlama G, Kondas K, Trexler M, Patthy L: **WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGFbeta1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity.** *The FEBS journal* 2010, **277**(24):5040-5050.
- Tajbakhsh S, Borello U, Vivarelli E, Kelly R, Papkoff J, Duprez D, Buckingham M, Cossu G: **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* 1998, **125**(21):4155-4162.
- Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH, Jr., Kull FC, Jr., Gonzalez-Cadavid N: **Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2001, **280**(2):E221-228.
- Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, Wolfman NM: **GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding.** *Growth Factors* 2001, **18**(4):251-259.
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R: **Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(51):40235-40243.

- Tintignac LA, Leibovitch MP, Kitzmann M, Fernandez A, Ducommun B, Meijer L, Leibovitch SA: **Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells.** *Experimental cell research* 2000, **259**(1):300-307.
- Tortora GJ, and Grabowski SR: **Principes d'anatomie et de physiologie.** *De Boeck-Wesmael Ed, Bruxelles* 1994.
- Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ: **Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size.** *American journal of physiology Cell physiology* 2009, **296**(6):C1258-1270.
- Trexler M, Banyai L, Patthy L: **A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(7):3705-3709.
- Trexler M, Banyai L, Patthy L: **Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules.** *Biological chemistry* 2002, **383**(1):223-228.
- Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y, Sugino H: **Identification and characterization of a novel follistatin-like protein as a binding protein for the TGF-beta family.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(52):40788-40796.
- Tzahor E, Kempf H, Mootoosamy RC, Poon AC, Abzhanov A, Tabin CJ, Dietrich S, Lassar AB: **Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle.** *Genes & development* 2003, **17**(24):3087-3099.
- Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R: **Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, **84**(23):8282-8286.
- Van de Peer Y: **Computational approaches to unveiling ancient genome duplications.** *Nature reviews Genetics* 2004, **5**(10):752-763.
- Vinciguerra M, Musaro A, Rosenthal N: **Regulation of muscle atrophy in aging and disease.** *Advances in experimental medicine and biology* 2010, **694**:211-233.
- von Scheven G, Alvares LE, Mootoosamy RC, Dietrich S: **Neural tube derived signals and Fgf8 act antagonistically to specify eye versus mandibular arch muscles.** *Development* 2006, **133**(14):2731-2745.
- Walling GA, Visscher PM, Wilson AD, McTeir BL, Simm G, Bishop SC: **Mapping of quantitative trait loci for growth and carcass traits in commercial sheep populations.** *Journal of animal science* 2004, **82**(8):2234-2245.
- Wang H, Zhang Q, Zhu D: **hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin.** *Biochemical and biophysical research communications* 2003, **311**(4):877-883.
- Wang Q, Keutmann HT, Schneyer AL, Sluss PM: **Analysis of human follistatin structure: identification of two discontinuous N-terminal sequences coding for activin A binding and structural consequences of activin binding to native proteins.** *Endocrinology* 2000, **141**(9):3183-3193.
- Webb EC, De Smet S, Van Nevel C, Martens B, Demeyer DI: **Effect of anatomical location on the composition of fatty acids in double-muscled Belgian Blue cows.** *Meat science* 1998, **50**(1):45-53.
- Welle S, Bhatt K, Pinkert CA, Tawil R, Thornton CA: **Muscle growth after postdevelopmental myostatin gene knockout.** *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2007, **292**(4):E985-991.
- West RL: **Red to white fiber ratios as an index of double muscling in beef cattle.** *Journal of animal science* 1974, **38**(5):1165-1175.
- White RB, Bierinx AS, Gnocchi VF, Zammit PS: **Dynamics of muscle fibre growth during postnatal mouse development.** *BMC developmental biology* 2010, **10**:21.
- Wieczorek DF, Periasamy M, Butler-Browne GS, Whalen RG, Nadal-Ginard B: **Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue-specific one, in extraocular musculature.** *The Journal of cell biology* 1985, **101**(2):618-629.
- Wiener P, Smith JA, Lewis AM, Woolliams JA, Williams JL: **Muscle-related traits in cattle: The role of the myostatin gene in the South Devon breed.** *Genetics, selection, evolution : GSE* 2002, **34**(2):221-232.
- Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS *et al.*: **Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(26):15842-15846.
- Wriedt C: **Die Vererbung des Doppellender – Kharacters dieRindern.** *Zeitschrift fuer Induktive Abstammungs und Verebnungslehre* 1929, **51**: 482–6.

- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH, Miyazono K: **Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects.** *The Journal of cell biology* 1995, **130**(1):217-226.
- Yang J, Ratovitski T, Brady JP, Solomon MB, Wells KD, Wall RJ: **Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice.** *Molecular reproduction and development* 2001, **60**(3):351-361.
- Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D: **Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression.** *Cancer research* 2006, **66**(3):1320-1326.
- Yang Z, Cheng B, Song J, Wan Y, Wang Q, Chen X: **Estrogen accelerates G1 to S phase transition and induces a G2/M phase-predominant apoptosis in synthetic vascular smooth muscle cells.** *International journal of cardiology* 2007, **118**(3):381-388.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS *et al.*: **Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival.** *Cell* 2010, **142**(4):531-543.
- Zhu X, Topouzis S, Liang LF, Stotish RL: **Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism.** *Cytokine* 2004, **26**(6):262-272.
- Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ: **Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin.** *Science* 2002, **296**(5572):1486-1488.

Annexes

Annexe 1-Liste des principales maladies neuromusculaires

Liste des principales maladies neuromusculaires d'après le site internet Dystrophie musculaire Canada : <http://www.muscle.ca> (Novembre 2011)

Nom de la maladie	Autre nom rencontré
Abêtalipoprotéïnémie	Maladie de Bassen-Kornzweig Acanthocytose
Adrénoleukodystrophie	
Adynamie épisodique de Gamstorp	Paralysie périodique hyperkaliémique
Amyloïdose	Amylose
Amyotrophie musculaire spinale et bulbaire	Syndrome de Kennedy Amyotrophie bulbo-spinale
Amyotrophie névralgique héréditaire	Syndrome de Parsonage-Turner
Amyotrophie spinale de type 1	Maladie de Werdnig-Hoffman Amyotrophie spinale infantile
Amyotrophie spinale de type 3	Maladie de Kugelberg-Welander Amyotrophie spinale juvénile
Amyotrophie spinale de type 4	Amyotrophie spinale de l'adulte
Amyotrophie spinale distale	
Amyotrophie spinale proximale de type 2	
Amyotrophie spinale scapulo-péronière	Syndrome de Stark-Kaeser
Amyotrophie spinale autre	
Arthrogrypose multiple congénitale	Myodysplasie Amyophasie congénitale
Ataxie avec déficit isolé en vitamine E	
Ataxie avec glaucome congénital	
Ataxie de Friedreich	
Ataxie spinocérébelleuse de Charlevoix-Saguenay	Ataxie récessive spastique autosomique de Charlevoix-Saguenay
Ataxie-télangiectasie	
Atrophie olivo-ponto-cérébelleuse	
Botulisme	
Cardiomyopathie dilatée familiale avec dystrophie musculaire	
Déficit en adénosine monophosphate déaminase	Déficit en myodénylate déaminase Déficit en AMP déaminase
Déficit en carnitine palmitoyltransférase I	
Déficit en déaminase	
Déficit en enzyme branchante	Glycogénose de type IV Maladie d'Andersen
Déficit en enzyme débranchante	Glycogénose type 3
Déficit en maltase acide	Maladie de Pompe Glycogénose de type II
Déficit en myophosphorylase	Maladie de McArdle

Déficit en phosphofructokinase	Maladie de Tarui Glycogénose de type 7
Déficit en récepteur à l'acétylcholine	Syndrôme myasthénique congénital
Déficit en transporteur cérébral de la carnitine	
Dermatomyosite	
Disproportion congénitale des fibres	
Dysautonomie familiale	Neuropathie sensitive et autonome héréditaire Syndrome de Riley-Day
Dystrophie musculaire	
Dystrophie musculaire congénitale	
Dystrophie musculaire de Becker	
Dystrophie musculaire de Duchenne	
Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss	
Dystrophie musculaire des ceintures	
Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale	Myopathie de Landouzy-Déjérine FSH
Dystrophie musculaire myotonique	
Dystrophie musculaire myotonique de type 1	Maladie de Steinert
Dystrophie musculaire myotonique de type 2	Myopathie myotonique proximale
Dystrophie musculaire oculaire	
Dystrophie musculaire oculopharyngée	
Dystrophie musculaire périonière	Maladie de Charcot-Marie-Tooth type 1 Neuropathies sensitivo-motrices héréditaires de type 1
Dystrophie musculaire tibiale	Myopathie distale de type Udd
Fibrose congénitale des muscles oculomoteurs	
Gammopathie monoclonale avec neuropathie	
Glycogénose (avec atteinte musculaire)	
Glycogénose neuromusculaire	Maladie de Pompe Déficit en maltase acide
Hyperthermie	Hyperthermie maligne
Hyperthermie maligne	
Hypoalphalipoprotéïnémie	Maladie de Tangier
Insensibilité congénitale à la douleur et anhidrose	Neuropathie sensitive et autonome héréditaire
Maladie d'Andersen	Glycogénose de type IV Déficit en enzyme branchante
Maladie de Charcot-Marie-Tooth	Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire Insensibilité congénitale à la douleur et anhidrose
Maladie de Danon	Glycogénose de type 2B
Maladie de Déjérine-Sottas	Neuropathie sensitivomotrice héréditaire Maladie de Charcot-Marie-Tooth
Maladie de Forbe	Glycogénose de type III
Maladie de Kennedy	Amyotrophie bulbo-spinale Atrophie musculaire spinale et bulbaire
Maladie de Kugelberg-Welander	Amyotrophie spinale proximale type 3 Amyotrophie spinale proximale juvénile

Maladie de McArdle	Déficit en myophosphorylase Glycogénose de type 5
Maladie de Pompe	Déficit en maltase acide Glycogénose de type 2
Maladie de Refsum	Maladie de Charot-Marie-Tooth Neuropathie sensitivo motrice héréditaire
Maladie de Steinert	Dystrophie musculaire myotonique de type 1
Maladie de Tangier	Alphalipoprotéïnémie
Maladie de Tarui	Glycogénose de type 7 Déficit en phosphofructokinase
Maladie de Thomsen	Myotonie congénitale
Maladie de Werdnig-Hoffman	Amyotrophie spinale proximale de type 1
Maladie des muscles ondulants	
Mixed Connective Tissue Overlap Disease	
Mononévrite multiple	
Myasthenie grave	
Myofasciite macrophagique	
Myoglobulinurie	
Myoglobulinurie à l'effort	
Myopathie à axe central	
Myopathie à corps d'inclusion	
Myopathie à corps réducteur	
Myopathie à corps zébré	
Myopathie à empreintes digitales	
Myopathie à minicore	
Myopathie à multi-minicores	
Myopathie à némaline	
Myopathie avec surcharge en desmine	Myopathie myofibrillaire
Myopathie centronucléaire	Myopathie myotobulaire
Myopathie congénitale	
Myopathie congénitale à agrégats tubulaires	
Myopathie congénitale bénigne	
Myopathie de Bethlem	Myopathie autosomique dominante bénigne
Myopathie de Brody	
Myopathie de Landouzy-Déjérine	Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale type 1A
Myopathie de Nonaka	
Myopathie distale	
Myopathie distale de type Laing	
Myopathie distale de type Miyoshi	
Myopathie distale de type Welander	Myopathie distale de type suédois
Myopathie distale autre	
Myopathie iatrogénique	
Myopathie mitochondriale	Neuropathie mitochondriale Mitochondrial Dna Breakage Syndrome Secondary To Nuclear Mutation

Myopathie myofibrillaire	Myopathie avec surcharge en desmine
Myopathie myotonique proximale	Dystrophie musculaire myotonique de type 2
Myopathie myotubulaire	Myopathie centronucléaire
Myopathie sarcotubulaire	
Myopathies des vasculites	
Myopathies vacuolaires	Myopathies avec autophagie excessive
Myosite	Myosite focale
Myosite à corps d'inclusion	
Myotonie chondrodystrophique	Syndrome de Schwartz-Jampel
Myotonie congénitale	Maladie de Thomsen
Neuromyotonie	Syndrome d'Isaac
Neuropathie à axones géants	
Neuropathie axonale avec surdité et retard de développement	
Neuropathie de Lyme	
Neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression	
Neuropathie hypomyélinisante congénitale	Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire Maladie de Charcot-Marie-Tooth
Neuropathie motrice multifocale avec bloc de conduction	
Neuropathie paranéoplastique	
Neuropathie périphérique et agénésie du corps calleux	Maladie de Charlevoix-Saguenay Syndrome d'Andermann
Neuropathie sensitive et autonome héréditaire de type 1	
Neuropathie sensitive et autonome héréditaire de type 2	Acroostéolyse
Neuropathie sensitive et autonome héréditaire de type 3	Dysautonomie familiale Syndrome de Riley-Day
Neuropathie sensitive et autonome héréditaire de type 4	Insensibilité congénitale à la douleur et anhidrose
Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire avec paraplegie spastique type 5	Maladie de Charcot-Marie-Tooth type 5
Neuropathie sensitivo-motrice héréditaire de type Lom	Maladie de Charcot-Marie-Tooth
Neuropathies sensitivo-motrices héréditaires de type 1	Amyotrophie péronière Maladie de Charcot-Marie-Tooth type 1 et sous-types
Neuropathies sensitivo-motrices héréditaires de type 2	Type neuronal d'amyotrophie péronière Maladie de Charcot-Marie-Tooth type 2 et sous-types
Neuropathies sensitivo-motrices héréditaires de type 3	Maladie de Déjérine-Sottas ou neuropathie hypertrophique de l'enfant Maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 3
Neuropathies sensorimotrices héréditaires de type 4	Maladie de Refsum Neuropathie hypertrophique avec accumulation

	d'acide phytanique maladie de Charcot-Marie-Tooth type 4
Paralysie périodique hyperkalémique	Maladie de Gamstorp
Paralysie périodique hypokalémique	
Paralysie périodique normokaliémique	
Paralysie périodique potassium sensible - dysrythmie cardiaque	Syndrome d'Andersen
Paralysie périodique	
Paramyotonie congénitale	Maladie d'Eulenberg
Plexopathie brachiale	
Polymyosite	
Polyneuropathie amyloïde familiale	Amylose familiale
Polyneuropathie inflammatoire chronique	
Polyneuropathie ou myopathie chez les patients en phase de soins critiques	
Porteuse symptomatique de la dystrophie musculaire de Duchenne ou de la dystrophie musculaire de Becker	Porteuse symptomatique
Syndrome CAPOS	Ataxie cérébelleuse - aréflexie - pieds creux - atrophie optique - surdité neurosensorielle
Syndrome d'Andermann	Neuropathie héréditaire sensitivomotrice avec agénésie du corps calleux Syndrome/maladie de Charlevoix - Saguenay
Syndrome de Barth	
Syndrome de Charlevoix-Saguenay	Neuropathie héréditaire sensitivomotrice avec a�n�sie du corps calleux Syndrome d'Anderman
Syndrome de Chudley-Lowry-Hoar	
Syndrome de Guillain-Barré	Polyradiculopathie aiguë inflammatoire démyélinisante
Syndrome de Kearns-Sayre	
Syndrome de Leigh	Encéphalomyopathie nécrosante subaiguë
Syndrome de Parsonage-Turner	Amyotrophie névralgique héréditaire
Syndrome de Riley-Day	Neuropathie sensitive et autonome héréditaire de type 3
Syndrome de Schwartz-Jampel	Myotonie chondrodystrophique
Syndrome de Walker-Warburg	
Syndrome d'Isaac	Neuromyotonie acquise
Syndrome du Lac St-Jean	Polyneuropathie �volutive
Syndrome muscle-oeil-cerveau	
Syndrome myasthénique congénital	Myasthénie congénitale
Syndrome myasthénique de Lambert-Eaton	

Annexe 2-Classification des carcasses de grands bovins

Source : Grille communautaire de classement des carcasses de gros bovins, office des publications officielles des communautés européennes.

Caractéristiques	Classe	Description
Etat d'engraissement	1	Très faible : Couverture de graisse inexistante à très faible. Pas de graisse à l'intérieur de la cage thoracique
	2	Faible : Légère couverture de graisse, muscle presque partout apparent. A l'intérieur de la cage thoracique, les muscles entre les côtes sont nettement visibles.
	3	Moyen : Muscle, à l'exception de la cuisse et l'épaule, presque partout couvert de graisse. A l'intérieur de la cage thoracique, les muscles entre les côtes sont encore visibles.
	4	Fort : Muscles couvert de graisse mais encore partielement visible au niveau de la cuisse et de l'épaule.
	5	Très fort : toute la carcasse est recouverte de graisse.
Conformation	S	Supérieure : tous les profils extrêmement convexes ; développement musculaire exceptionnel avec double musculature (type culard).
	E	Excellente : tous les profils convexes à superconvexes ; développement musculaire exceptionnel.
	U	Très bonne : profils convexes dans l'ensemble ; fort développement musculaire.
	R	Bonne : profils rectiligne dans l'ensemble ; bon développement musculaire.
	O	Assez bonne : profils rectiligne à concaves ; développement musculaire moyen.
	P	Médiocre : tous les profils concaves à très concaves ; développement musculaire réduit.

Etat d'engraissement

1- Très faible 2- faible 3- moyen 4- fort 5- Très fort

S- supérieur **E- Excellente** **U- Très bonne**

Conformation

R- bonne **O- assez bonne** **R- médiocre**

Detailed description: This image is a reference chart for lamb carcass evaluation. It is organized into two main sections: 'Etat d'engraissement' (Fatness State) and 'Conformation' (Conformation). The 'Etat d'engraissement' section at the top features five columns, each representing a grade from 1 to 5. Each column contains two images: a side view of the carcass and a top-down view of the ribcage. The fatness increases from column 1 (1- Très faible) to column 5 (5- Très fort). Below this are three rows, each representing a conformation grade: 'S- supérieur', 'E- Excellente', and 'U- Très bonne'. Each row contains two images: a side view and a top-down view. The 'Conformation' section at the bottom features three columns, each representing a grade: 'R- bonne', 'O- assez bonne', and 'R- médiocre'. Each column contains two images: a side view and a top-down view. The conformation quality decreases from column 1 (R- bonne) to column 3 (R- médiocre).

Table des Matières

Remerciements	3
Publications et communications.....	5
Publications	5
Communications écrites	5
Communication orale	5
Liste des abréviations	7
Sommaire	9
Avant-propos	11
Exposé bibliographique.....	13
I-Formation du muscle squelettique au cours du développement embryonnaire : Première phase de la myogenèse	15
I-1-Régulations intracellulaires pendant la myogenèse	15
I-1-a-Formation des muscles du tronc et des membres, importance de PAX3	16
I-1-b-Formation des muscles du crâne	18
I-2-Régulation de la myogenèse par des facteurs sécrétés	18
I-3-Rôle des microARN dans la myogenèse	20
II-Croissance fœtale du muscle squelettique : seconde phase de la myogenèse.....	21
III-Croissance et réparation postnatales des fibres musculaires : Troisième phase de la myogenèse	22
IV-Anatomie et structure du muscle squelettique	27
V-Les différents types de fibres musculaires	31
VI-Les pathologies du muscle squelettique et les phénotypes d'hypermusculature	34
VI-1-Les maladies neuromusculaires	34
VI-2-Les cachexies.....	37
VI-3-La malnutrition	37
VI-4-La sarcopénie.....	38
VI-5-Les phénotypes d'hypermusculature chez les animaux d'élevage	40
VI-5-a-Le phénotype Double Musculature (DM) chez le bovin.....	40
VI-5-b-Le phénotype DM chez les autres animaux d'élevage.....	44
VII-La myostatine	45
VII-1-Structure et fonction.....	45
VII-2-Régulation de la myostatine	49
VII-3-Rôle dans les phénotypes d'hypermusculature	53
VII-4-Rôle dans les pathologies du muscle squelettique	56
VIII-GASP1 et GASP2	57
IX-But et stratégie d'étude	62
Chapitre 1 : Etude <i>in vivo</i> du rôle de <i>Gasp1</i> dans le muscle	63
Publication 1: <i>In vivo</i> characterization of the role of <i>Gasp1</i> in skeletal muscle function....	67
Résultats complémentaires	88
Matériels et méthodes.....	88
Résultats et discussion.....	91
Chapitre 2 : Aspects évolutifs des fonctions de GASP1 et GASP2	93
Publication 2: GASP/WFIKK proteins: evolutionary aspects of their functions.....	97

Chapitre 3 : Analyses phénotypique et moléculaire d'une lignée de souris ENU : la lignée GMA06.....	119
Crible de mutagenèse à l'éthyl-nitroso-urée (ENU)	121
Publication 3 : A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome: study of muscle characteristics.....	125
Discussion générale.....	127
Bibliographie.....	133
Annexes.....	147
Annexe 1-Liste des principales maladies neuromusculaires.....	149
Annexe 2-Classification des carcasses de grands bovins.....	154
Table des Matières	156
Table des illustrations.....	158
Table des tableaux	159

Table des illustrations

Figure 1 : formation du myotome (d'après Gilbert, <i>Developmental Biology</i> 6th edition)...	14
Figure 2 : rôles des MRFs durant la myogenèse chez les vertébrés	14
Figure 3 : les différentes cascades de signalisation déclenchant la myogenèse (d'après Braun et Gautel, 2011)	17
Figure 4 : facteurs sécrétés lors de la première phase de la myogenèse (d'après Bryson Richardson et Currie 2008)	20
Figure 5 : croissance et réparation du muscle adulte par les cellules satellites (d'après Boldrin, Muntoni et Morgan 2010)	22
Figure 6 : voie de régulation de la synthèse et de la dégradation protéique dans le muscle (d'après Braun et Gautel 2011)	24
Figure 7 : les trois phases de la myogenèse	26
Figure 8 : anatomie du muscle squelettique (modifiée d'après une figure des éditions McGraw-Hill).....	28
Figure 9 : structure du muscle squelettique	29
Figure 10 : structure d'une triade : tubule T, réticulum sarcoplasmique, citerne terminale (d'après Al-Qusairi et Laporte 2011).....	30
Figure 11 : coloration ATPase pH 4,6	31
Figure 12 : description du phénotype culard chez le bovin	41
Figure 13 : phénotype Double Musculature chez le mouton Texel belge et le lévrier	45
Figure 14 : maturation de la myostatine (d'après Huang <i>et al.</i> 2011)	46
Figure 15 : régulation extra-cellulaire de la myostatine par clivage (d'après Anderson <i>et al.</i> 2008).	50
Figure 16 : mutations importantes dans le gène de la myostatine (d'après Grobet <i>et al.</i> 1997).....	55
Figure 17 : structure modulaire de GASP1 murin	58
Figure 18 : affinités des protéines GASP avec GDF8, GDF11 et le propeptide de GDF8 (ProMyo) ainsi que différents fragments de GASP1, déterminées par résonance des plasmons de surface. (Kondas <i>et al.</i> 2008).....	60
Figure 19 : effets de GASP1 <i>in vivo</i> après une injection locale de AAV-1-<i>Gasp1</i>, AAV-1-<i>Fs</i> (follistatine), AAV1-<i>Frlg</i> (<i>Fstl3</i>) ou AAV1-<i>Gfp</i> (contrôle). Les animaux ont subi des injections dans les membres inférieurs à l'âge de 3 semaines (Rodino-Kaplapc <i>et al.</i> 2009)....	61
Figure 20 : gènes variant sur les animaux âgés de 12 semaines	92
Figure 21 : théorie des deux duplications complètes du génome	94
Figure 22 : mutations causées par l'ENU	120
Figure 23 : crible sensibilisé réalisé au sein de l'UGMA	122
Figure 24 : phénotype des souris GMA06. (Magnol <i>et al.</i> 2010)	124

Table des tableaux

Tableau 1 : principales isoformes de myosines exprimées dans le muscle squelettique chez l'homme	32
Tableau 2 : liste des principales maladies génétiques affectant les muscles squelettiques (d'après le site internet Dystrophie musculaire Canada, http://www.muscle.ca)	35
Tableau 3 : facteurs neurologiques et musculaires impliqués dans l'apparition de la sarcopénie (d'après Kenneth S. O'Rourke 2011)	39
Tableau 4 : informations sur la structure de <i>Gasp1</i>	58
Tableau 5 : informations sur la structure de <i>Gasp2</i>	59
Tableau 6 : liste des gènes présents sur la plaque TLDA	89

Résumé :

Le développement et la croissance du muscle squelettique sont conditionnés par des processus complexes impliquant de nombreux facteurs moléculaires dans les différentes étapes de prolifération, de différenciation, et de fusion cellulaire. La compréhension de la régulation de la masse musculaire représente de réels enjeux aussi bien dans le domaine de la santé que d'un point de vue agronomique. Ainsi, l'identification des mécanismes moléculaires participant à l'hypertrophie musculaire a un intérêt particulier pour l'amélioration des thérapies lors d'atrophies musculaires ou pour des applications liées à la production de viande. Dans ce contexte, mes travaux de cette thèse ont porté sur le développement et la caractérisation de deux lignées murines présentant un phénotype hypermusclé. Le premier modèle, dénommé surGasp1, m'a permis de démontrer que la surexpression ubiquitaire du gène *Gasp1*, codant pour un inhibiteur de la myostatine, entraîne une augmentation généralisée de la masse musculaire due à une hypertrophie des fibres de types I, IIa et IIb sans qu'aucune altération du tissu adipeux ne soit observée. Ce modèle constitue un excellent outil pour appréhender le rôle de GASP1 lors du développement musculaire, en particulier ses relations avec la myostatine (GDF8) qui est un élément clé dans la régulation de la croissance du muscle. Par ailleurs, j'ai entrepris une étude de la protéine GASP1 au cours de l'évolution. L'analyse du taux de substitutions des protéines GASP de l'ancêtre de *Ciona* aux tétrapodes a permis de montrer que les domaines importants dans l'interaction avec la myostatine étaient les plus conservés. L'ensemble des résultats obtenus m'a conduit à proposer un modèle en trois dimensions qui permet de décrire l'action de la protéine GASP. La deuxième lignée murine analysée, GMA06, issue d'un crible de mutagenèse chimique sensibilisé, présente un phénotype hypermusclé qui diffère de celui observé chez des souris knockout pour la myostatine. L'identification de la mutation responsable de ce phénotype permettra de mieux comprendre les éventuelles interactions et régulations qui peuvent exister entre cette dernière et la myostatine et constitue par conséquent un modèle intéressant pour l'étude fonctionnelle de gènes modificateurs du phénotype *Gdf8*^{-/-}.

Mots-clefs : Gasp, myostatine, développement musculaire, modèle souris, évolution

Abstract:

Skeletal muscle development and growth are tightly regulated processes involving multiple factors which control different cellular programs such as proliferation, differentiation and fusion. Understanding muscle mass regulation represents key issues in public health or agronomy. Thus, the identification of molecular mechanisms participating in muscular hypertrophy has major interest for therapies improvement of muscular atrophy or for applications in meat production. In this context, the work of my thesis concerned the development and characterisation of two mouse lines presenting a hypermuscular phenotype. The analysis of the first model, called surGasp1, showed that the ubiquitous overexpression of the *Gasp1* gene leads to a generalized increase of muscular mass due to a hypertrophy of the type I, IIa and IIb fibres without change of the fatty tissue amount. This model provides an excellent tool to study the GASP1 function during the muscular development, in particular its role in relationship with the myostatin, a key factor in muscle growth regulation. I have also undertaken a study of the GASP1 protein during evolution. The substitution rate analysis from the ancestor of *Ciona* to tetrapods showed that the important domains in the interaction with the myostatin (GDF8) were the most preserved. These data allow me to propose a three dimensional model describing the GASP protein action. The second mouse line, GMA06, resulting from a sensitized mutagenesis screen, presents a hypermuscular phenotype which differs from the one observed in myostatin knockout mice. The identification of the causal mutation in this line will allow to better understand the interactions which could exist between this last one and the myostatin and constitutes an interesting model for functional studies of gene modifiers of the *Gdf8*^{-/-} phenotype.

Keywords: Gasp, myostatin, muscular development, mouse model, evolution