

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie, Santé
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
Unité de Génétique Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Génomique et Génétique Moléculaire

présentée et soutenue par

Claire BOUYER

le 17 Décembre 2014

**Variabilité phénotypique du développement musculaire chez le bovin :
Analyse fine de la régulation du gène *GDF8* codant la myostatine**

Thèse dirigée par le Professeur Ahmad OULMOUDEN

JURY

Rapporteurs	M. Pascal MAIRE,	D. R. INSERM, Institut Cochin, Paris
	Mme Juliette RIQUET	D. R. INRA, Toulouse
Examineurs	Mme Hélène JAMMES,	D. R. INRA, Jouy-en-Josas
	Mme Carole CHARLIER,	Maître de Recherche, FNRS, Liège
	Mme Véronique BLANQUET,	Pr. Université de Limoges
	M. Hubert LEVEZIEL,	D. R. INRA, Limoges
	M. Ahmad OULMOUDEN	Pr. Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie, Santé
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
Unité de Génétique Moléculaire Animale
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Génomique et Génétique Moléculaire

présentée et soutenue par

Claire BOUYER

le 17 Décembre 2014

Variabilité phénotypique du développement musculaire chez le bovin : Analyse fine de la régulation du gène *GDF8* codant la myostatine

Thèse dirigée par le Professeur Ahmad OULMOUDEN

JURY

Rapporteurs	M. Pascal MAIRE, Mme Juliette RIQUET	D. R. INSERM, Institut Cochin, Paris D. R. INRA, Toulouse
Examineurs	Mme Hélène JAMMES, Mme Carole CHARLIER, Mme Véronique BLANQUET, M. Hubert LEVEZIEL, M. Ahmad OULMOUDEN	D. R. INRA, Jouy-en-Josas Maître de Recherche, FNRS, Liège Pr. Université de Limoges D. R. INRA, Limoges Pr. Université de Limoges

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »

– Albert Einstein –

Remerciements

Je remercie les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de juger mon travail et de bien vouloir être présents pour ma soutenance. M. Hubert Leveziel, je vous remercie d'avoir accepté d'être président de ce jury. M. Pascal Maire et Mme Juliette Riquet, je vous remercie d'avoir accepté d'en être les rapporteurs et Mme Hélène Jammes, Mme Carole Charlier et Mme Véronique Blanquet, d'en être les examinatrices. Pour la plupart vous venez des quatre coins de la France et même de Belgique, je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à mon travail et pour bien vouloir faire tout ce trajet jusqu'à Limoges pour être présents à ma soutenance.

Hélène, je vous adresse un remerciement particulier car vous m'avez toujours soutenue dès le moment où j'ai mis les pieds dans votre équipe de recherche à Jouy-en-Josas, au cours de mon Master. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour être toujours disponible lorsque j'ai besoin de conseils, qu'ils soient personnels ou professionnels. J'ai aussi une grosse pensée pour quelques autres membres de la BDR ; Hélène Kiefer et Anne Gabory, toujours disponibles et de bons conseils, Audrey Prezelin ma super copine et sans oublier Evelyne Campion et Michel Guillomot.

Je remercie le Département de Génétique Animale de l'INRA, le conseil Régional du Limousin et l'Université de Limoges pour leur soutien financier. Je remercie grandement M. Denis Milan, directeur du département de Génétique Animale pour son soutien.

Je remercie M. Abderrahman Maftah, directeur de notre unité, l'UMR 1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire.

J'en viens maintenant aux remerciements consacrés à mon directeur de thèse, M. Ahmad Oulmouden. En une phrase je dirais que grâce à vous Ahmad, j'ai pu effectuer mes trois ans de thèse dans les meilleures conditions possibles. Mais comme une seule phrase ne suffirait pas pour décrire ma gratitude envers vous je poursuis. Ahmad, je vous remercie de m'avoir choisie pour débiter ce projet de recherche ensemble. Venue de la région parisienne, le cordon ombilical à peine coupé vous m'avez accueillie à bras ouverts et m'avez immédiatement accordée votre confiance. Vous êtes une personne extrêmement

compréhensive et ces trois ans à vos côtés m'ont permis de gagner en maturité et de dire au revoir à ce monde merveilleux des bisounours, à mon rythme et en douceur. Votre disponibilité et nos discussions régulières sur les procédures à suivre nous ont permis d'atteindre notre objectif. De plus, vous avez toujours écouté mon point de vu et mes suggestions et je vous en remercie. Enfin, je penserai sûrement à vous quand j'entendrai Charles Trenet, Michel Fugain, Richard Anthony ou les choristes passer à la radio ! Sans oublier évidemment cette réplique culte dans Harry Potter : « Seigneur ! ».

Je remercie M. Gilles Renand de l'UMR 1313 GABI de l'INRA de Jouy-en-Josas pour ses analyses d'association et M. Daniel Petit de l'UMR 1061 pour son aide quant à la compréhension de ces analyses.

Je remercie toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont permis d'avancer au cours de cette thèse. Je pense notamment à tous les membres de l'UMR 1061, avec bien sur une grosse pensée pour les thésards de l'unité avec en particulier un grand merci à Amel, Carole et Mélanie.

Dès mon arrivée Amel, tu m'as prise sous ton aile, tu as commencé par me faire visiter la ville puis tu m'as fait visiter ton cœur ce qui a fait naître une belle amitié entre nous. Entre les cours de gym-tonic, de zumba, les séances de ciné à 22h où à coup sûr je m'endormais, et cela, quelque soit le degré d'action du film, on peut dire qu'on ne s'est pas ennuyée ! Tu as toujours été de bons conseils, dans le cadre professionnel ou personnel, je t'en remercie.

Carole, j'ai fait au mieux pour faciliter ton intégration à ton arrivée. Bien que le mien soit minime à côté du tiens, je sais à quel point l'éloignement de la famille est dur et j'espère qu'aujourd'hui tu te sens bien à nos côtés. Ma chère voisine du dessous, jamais bien loin du haut de ton 16^{ème} étage, tes conseils m'ont beaucoup apportée et nos discussions me manqueront. Ensemble, nous avons partagé aussi bien des pique-niques (et baignades...) à Saint-Pardoux, que de l'accrobranche ! Nous ne pourrons pas oublier ce moment où tu es restée coincée en haut de ton arbre... !! Sans oublier ses moments de partages de ta cuisine libanaise qu'ils soient autour d'un bon petit brunch dominical ou d'une boîte Tupperware®!

Mélanie, ou l'incroyable histoire de la rencontre avec mon contraire. Sportive et imprévisible, d'apparence discrète, calme et posée (euh juste d'apparence je précise bien),

cette sacochette m'en a fait voir de toutes les couleurs et je lui en suis très reconnaissante ! Tu m'as temporisée. Voilà que je pars alors qu'il me reste tellement de cases à cocher avec toi dans ma liste des « choses à faire avant 30ans » ! Dernière case cochée en date ? Apprendre le pô...euh...chut c'est un secret en fait ! Je ne m'étendrai donc pas sur toutes les cases cochées ensemble...Comme par exemple, goûter aux savoureuses amourettes de la frairie des petits ventres de Limoges ! Ces couilles de moutons étaient excellentes !... Ou bien apporter un marqueur à une soirée des doctorants et écrire mon numéro sur le visage de ...euh... : fait ! Mais comme on dit ce qu'il se passe à Égletons reste à Égletons ! Merci Mel !

Je souhaite également bon courage aux nouvelles arrivantes, Caroline et Jessica ! J'ai aussi une pensée pour Caroline partie tracer sa route à Ottawa, Nathalie qui a préféré la chaleur de Nice, Luce bien sûr que je remercie pour sa disponibilité et ses conseils, Audrey, Ryan et Bilal. Je remercie Stéphane, Nico et JC du labo d'à côté pour ces soirées passées à l'O'Bryen ! Victor, aussi mon collègue de théâtre, je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse !

Khaled, mon super collègue de labo, je te remercie pour tous tes conseils, pour ces longues discussions professionnelles et personnelles. Je te remercie aussi de m'avoir présentée ton meilleur copain M. Google Research ! En revanche, je ne sais pas si je dois te remercier de m'avoir fait découvrir le délicieux kiosque à pizza. En cette fin de rédaction, mon estomac commence à crier au secours avec toutes ces pizzas à répétition !

Anne, je me souviendrai toujours de tes rires dans les bons moments de la vie, et je te remercie du fond du cœur pour ton soutien dans les mauvais moments. Je n'oublierai pas ce TP dissection du poussin et nos vendredi cantines, un vrai moment pour évacuer, avec un capuccino pour Khaled, une infusion pour Anne, un chocolat viennois pour moi et bien sur une part de tarte au citron meringuée pour Amel !

Je vous remercie Vincent, Delphine (et votre petite Eva bien sur), pour votre amitié et pour ces délicieuses soirées passées ensemble ! Je garderai l'image de Luce et Vincent, à fond derrière les bleus pour la coupe du monde et leur déception après la défaite...! Et bien sur je vous remercie de m'avoir fait découvrir cette machine secrète mais révolutionnaire qui va bientôt arriver dans nos foyers...!

Je remercie Almine et Sylvia d'avoir été présents au cours de ma première année de thèse et de m'avoir appris tant de chose. Sylvia, j'ai découvert un peu tard les plaisirs de la cueillette mais je ne regrette pas d'y avoir goûté !

Je remercie Débora, toujours disponible et avec le sourire ! Je t'embrasse. Odile, tu viens d'arriver parmi nous mais je te remercie pour les services que tu as déjà eu le temps de me rendre ! Je remercie aussi Lionel, Karine, Emilie, Nathalie et Fabienne pour leur aide technique ! Je remercie Fabrice pour son aide quant à la mise en page de ce manuscrit !

Je remercie les stagiaires de Master 1 de la promotion 2013/2014 avec qui j'ai fait les 400 coups. J'embrasse tout particulièrement Alexis et Florian mes deux chouchous!

Je remercie mon fan de Batman préféré, qui après avoir réussi à enlever ces traces de marqueurs, ne m'en a pas trop voulu et m'a permis par la suite de me sortir la tête de la thèse quand il le fallait et de profiter au mieux de ces derniers mois à Limoges.

Je remercie « beau barman » pour tous les verres de grenadine (oui oui j'ai bien dit grenadine !) qu'il a pu me servir au cours de ma thèse !

Je remercie les membres de « La Balise » qui m'ont supportée pendant ces trois années et les membres du « LPC » qui m'ont permis de découvrir et d'apprendre le poker, avec un clin d'œil particulier pour Tagada.

Je remercie ma Clio blanche qui ne m'a jamais lâchée malgré tous ces allers-retours PARIS-LIMOGES ! De là où tu es maintenant, j'espère que tu ne m'en veux pas de t'avoir moi-même lâchée pour ma nouvelle Twingo rose !

Je ne peux pas écrire mes remerciements sans nommer Pradip, même si je ne sais pas s'il lira ces mots. Tu as fait parti de ma vie pendant si longtemps et je crois bien que sans toi je n'aurai pas eu mon Bac alors, merci !

Je remercie énormément Typhaine, ma copine du lycée. Je remercie Shirin, Orianne, Julien et Fabien, les fêlés du bocal. Et je remercie Cécile, Camille et aussi Amandine, nouvellement maman !

Je tiens évidemment à remercier chaleureusement toute ma famille. Mes parents d'abord, qui m'ont donné la vie il y a 26 ans. L'amour qu'ils m'ont apporté m'a permis de m'épanouir et d'avancer dans la vie. Ils ont toujours été présents et m'ont toujours soutenue dans les bons et les mauvais moments et cela quelques soient les choix que j'ai faits. Ce

soutien indéfectible et la fierté dans leurs yeux malgré les échecs m'ont permis de toujours garder confiance en moi. Dans les mauvais moments, la chanson que tu me chantais maman me permettait toujours de retrouver le sourire : He oui ! Un bon « ça va d'aller » et c'était reparti !

Je remercie aussi mes sœurs Annabel et Sophie, qui m'ont accompagnée tout au long de ma vie. Malgré le fait qu'elles étaient surtout présentes pour une bonne dispute, toujours à vouloir martyriser la petite dernière, aujourd'hui j'y repense avec le sourire.

Annabel et Damien je vous remercie plus particulièrement d'avoir engendré cette petite terre qui illumine mes jours. Lucas, tes rires et tes bêtises d'enfants que je me repassais en boucle en vidéo à cause de la distance, m'ont permis de garder le moral durant ces trois années. Même si je dois préciser qu'au début les seuls mots que tu disais à mon égard étaient « non pas tata Claire ». Le temps passe Caillou, et déjà tu dois faire une petite place à Mousseline qui arrive bientôt.

J'ai une grosse pensée pour mes deux grands-mères qui à coup sûr auraient été fières de moi !

Je fais un gros bisou à ma Poupette qui ne me quitte pas depuis 5 ans ! Bisous à Sissi, Pikachu et Féria. Une grosse pensée pour Marguerite, Léa, Ferrari, Enzo, Rosalie, Lulu, Ziboulo...

Enfin, j'embrasse aussi mon grand-père, mes oncles et tantes et j'envoie des énormes bisous pour tous mes cousins/cousines !

Merci à tous !



Publications et communications

Publication

- 2014** **“Deep intronic mutation and pseudo exon activation as a novel muscular hypertrophy modifier in cattle”.**
Claire BOUYER¹, Lionel FORESTIER¹, Gilles RENAND² et Ahmad OULMOUDEN¹.
¹UMR 1061 INRA/Université de Limoges, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Limoges, France.
²UMR 1313 INRA, Unité de Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-josas, France.
Plos one.

Communications orales

- 2014** **“Phenotypic variability of muscle development in Blonde d’Aquitaine cattle: accurate analysis of *GDF8* gene encoding myostatin”.**
Claire BOUYER et Ahmad OULMOUDEN.
17^{ème} séminaire des thésards du département de Génétique Animal, INRA.
23 et 24 avril 2014. *Jouy-en-Josas, France.*

Communications écrites (posters)

- 2014** **“A new phenotype-modifying mechanism that buffers nonsense mutations and avoids the extreme overgrowth of muscular tissue in the cattle.”**
Claire BOUYER et Ahmad OULMOUDEN.
13^{ème} congrès international sur les maladies neuromusculaires.
5 au 10 juillet 2014. *Nice, France.*
- 2012** **“Phenotypic variability of muscle development in cattle: accurate analysis of *GDF8* gene encoding myostatin”.**
Claire BOUYER et Ahmad OULMOUDEN.
15^{ème} séminaire des thésards du département de Génétique Animale, INRA.
26 et 27 mars 2012. *Ile d’Oléron, France.*

Liste des Abréviations

3T3-L1	Cellules fibroblastiques de souris	Co-Smad	<i>Common-partner Smad</i>
Ach	Acétylcholine	Ct	<i>Threshold cycle</i>
ActR	Récepteur à l'activine	DDL	Degré de liberté
ADN	Acide désoxyribonucléique	Dlk1	<i>Delta-Like 1 Homolog</i>
ADNc	ADN complémentaire	DM	<i>Double-muscled</i>
ADP	Adénosine diphosphate	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Akt	Protéine kinase B	DNase	Deoxyribonucléase I
Alk	<i>Activin-like kinase</i>	DTT	Dithiothréitol
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	DVR	<i>Decapentaplegic-Vg-Related</i>
AP1	<i>Activating protein 1</i>	EGF	Facteur de croissance épidermique
ARE	<i>Androgen response element</i>	ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ARN	Acide ribonucléique	Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ARNm	ARN messager	FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
ATF2	<i>Activating Transcription Factor 2</i>	Fig.	Figure
ATP	Adénosine triphosphate	FLRG	<i>Follistatin-Related Gene</i>
BA	Blonde d'Aquitaine	FoxO	<i>Forkhead box protein O</i>
BBB	Blanc Bleu Belge	F-ratio	Ratio entre les variances inter et intra-variable
BC	Back-cross	GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
bHLH	<i>Basic helix-loop-helix</i>	GASP1	<i>Growth and differentiation associated serum protein 1</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	GDF	<i>Growth Differentiation Factor</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>	GLM	<i>Generalized linear model</i>
C2C12	Cellules myoblastiques de souris	GM	<i>Growth medium</i>
Ca²⁺	Ion calcium	GPDH	glycerol-3-phosphate déshydrogénase
CARBC	Animaux de Carmaux de génération back-cross	GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
CARBF2	Animaux de Carmaux de génération F2	GSK3-β	Glycogène synthase kinase 3
CASC3	<i>Cancer susceptibility candidate 3</i>	Gtl2/Meg3	<i>Maternally expressed gene 3</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>	HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Cf.	Confère	Hes	<i>Enhancer of split</i>
CLPG	Locus Callipyge	HGF/SF	<i>Hepatocyte growth factor/Scatter factor</i>
cm	centimètre	hRluc	<i>Renilla luciférase</i>

hSGT	<i>Human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein</i>	MSTN	Myostatine
HuSkMC	Lignée myoblastique humaine	MSV	<i>Myostatin splice variant</i>
ICR	<i>Imprinting control region</i>	mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>	mTORC	<i>mTOR signaling Complex</i>
IFN	Interféron	MuRF-1	<i>Muscle RING-Finger protein-1</i>
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique	Myf	<i>Myogenic factor</i>
I-Smad	<i>Inhibitory Smad</i>	MYH	<i>Myosin Heavy Chain</i>
JNK	Jun-N-terminale kinase	MyoD	<i>Myoblast Determination protein 1</i>
kDa	kiloDalton	N	Normal
LAP	<i>Latency Associated Peptide</i>	Na⁺	Ion sodium
Lbx1	<i>Ladybird homeobox protein homolog 1</i>	NaCl	Chlorure de sodium
Lfng	<i>Lunatic Fringe</i>	NaOH	Hydroxyde de sodium
LTBP	<i>Latent TGF-β Binding Protein</i>	NF-κB	<i>Nuclear factor NF-kappa-B</i>
luc2	<i>Firefly luciferase</i>	NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i>
m	maternelle	NUP	<i>Nested Universal Primer</i>
mA	milliAmpère	p.	page
MADS	<i>MCM1, Agamous, Deficiens, SRF</i>	p	paternel
MAFbx	<i>Muscle Atrophy F-box (Atrogin-1)</i>	P	Phosphate
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	PACE	<i>Paired basic amino acid cleaving enzyme</i>
MCM1	<i>Methylmalonyl-CoA mutase 1</i>	Pax	<i>Paired-box</i>
mdx	<i>X-linked muscular dystrophy</i>	pb	paire de base
MEF	<i>Myocyte specific Enhancer Factor</i>	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Meg8	<i>Maternally expressed gene 8</i>	Peg11/Rtl1	<i>Retrotransposon-like protein 1</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>	pH	potentiel hydrogène
mesp2	<i>Mesoderm posterior protein 2</i>	Pi	phosphate inorganique
mh	<i>Muscle hypertrophy</i>	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
MHC	Myosin heavy chain	PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
miRNA	microARN	PRE	<i>Progesterone response element</i>
MRF	facteurs de régulation myogénique	RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA end</i>
ms	milliseconde		

RAPTOR	<i>Regulatory-Associated Protein of mTOR</i>	P_NAIS	Poids à la naissance
Rb	Rétinoblastome	p140	poids vif à 140 j
RE	Réticulum endoplasmique	gmq	gain moyen quotidien
RICTOR	<i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>	age_fin	âge dernière pesée en vif
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>	pv_fin	dernier poids vif
R-Smads	<i>Receptor-regulated Smads</i>	arri_v	pointage arrière en vif
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>	dess_v	pointage dessus en vif
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>	epau_v	pointage épaule en vif
SF3A1	<i>Splicing factor 3a, subunit 1</i>	synt_v	pointage synthétique muscularité en vif
Shh	Sonic hedgehog	vent_v	pointage rétraction ventre en vif
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise	os_v	finesse os canon en vif
SLRP	<i>Small Leucine-Rich Proteoglycan</i>	cuir_v	finesse du cuir en vif
SMAD	<i>Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog</i>	etat_v	note d'état en vif
snRNA	<i>Small nuclear ribonucleic acid</i>	rdt_c	rendement en carcasse
SRF	<i>Serum Response Factor</i>	p_carc	poids de carcasse
TAK1	<i>TGF-β-Activated Kinase 1</i>	arri_c	pointage arrière carcasse
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>	dess_c	pointage dessus carcasse
TBS-T	<i>Tris-buffered saline tween added</i>	epau_c	pointage épaule carcasse
TGF	<i>Transforming growth factor</i>	synt_c	pointage synthétique muscularité carcasse
TLL2	<i>Tolloid-like protein 2</i>	n_couv	pointage gras couverture carcasse
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	n_intr	pointage gras interne carcasse
TRE	<i>Thyroid hormone response elements</i>	COUL_C	couleur viande
UMR	Unité mixte de recherche	CUDG	épaisseur de cuisse carcasse
UPM	<i>Universal Primer Mix</i>	JSDG	longueur de cuisse du jarret à la symphyse pubienne carcasse
UTR	<i>Untranslated Region</i>	LTDG	longueur de carcasse
Wnt	<i>Wingless-type MMTV integration site family member</i>		

Table des matières

Avant-propos.....	1
Introduction Bibliographique.....	9
I. Le développement musculaire.....	9
1. Le muscle.....	9
a) Les différents types de muscle.....	9
b) Organisation du muscle squelettique des vertébrés.....	13
c) Les sarcomères, unités contractiles du muscle.....	13
d) Mécanismes de contraction musculaire.....	15
e) Différents types de fibre.....	17
2. La myogenèse.....	21
3. Variabilité phénotypique du développement du muscle squelettique.....	29
a) Atrophie et hypertrophie musculaire : la balance entre synthèse et dégradation protéique.....	29
b) Des phénotypes d'atrophie, de dystrophie et d'hypertrophie musculaire chez l'homme.....	31
c) Phénotypes naturels d'hypertrophie musculaire chez d'autres espèces.....	37
4. Historique du phénotype hypermusclé bovin.....	45
5. Description du phénotype d'hypertrophie musculaire bovin.....	47
a) Caractéristiques morphologiques et bouchères.....	47
b) Reproduction des bovins hypermusclés.....	51
6. Origine génétique du phénotype d'hypertrophie musculaire : découverte du locus <i>mh</i>	59
II. La <i>myostatine</i> : gène majeur du développement musculaire.....	65
1. Découverte du gène <i>myostatine</i>	65
a) La superfamille des TGF- β	65
b) Identification de la myostatine.....	67
c) Profil d'expression.....	69
2. Structure et transcrits du gène <i>myostatine</i>	71
a) Structure du gène et homologies entre espèces.....	71
b) Différents transcrits par épissage alternatif.....	75
3. Structure et régulation de la myostatine.....	77
a) Maturation.....	77
b) Régulations de la myostatine.....	81
c) Signalisation.....	93
4. Rôle biologique.....	101
a) Dans le muscle squelettique.....	101
b) Dans le tissu adipeux.....	111
5. Thérapie génique par inhibition de la myostatine.....	113

a)	Traitement des myopathies.....	115
b)	Suppléments alimentaires.....	123
c)	Amélioration de la qualité de la viande.....	123
6.	La myostatine et le locus <i>mh</i> associés au phénotype d'hypertrophie musculaire...	125
III.	La race Blonde d'Aquitaine.....	131
1.	Historique de la race.....	131
2.	Caractéristiques morphologiques et potentiel économique.....	133
	Projet de recherche.....	135
	Matériel et méthodes.....	141
1.	Echantillons musculaires d'animaux de race Blonde d'Aquitaine.....	141
2.	Extractions ARN et ADN.....	141
3.	RT-PCR et RT-PCR quantitative en temps réel.....	141
4.	Séquençage de l'intron 2 du gène <i>myostatine</i>	143
5.	Tests de RFLP-PCR.....	145
6.	Analyses statistiques.....	145
7.	5' et 3' RACE.....	149
8.	Test Luciférase.....	149
a)	Construction plasmidique.....	149
b)	Culture cellulaire et transfection.....	151
9.	Western blot.....	153
10.	Test Elisa.....	155
	Résultats et discussion.....	159
I.	Découverte de l'allèle favorable à une hypertrophie musculaire chez la race Blonde d'Aquitaine.....	159
1.	Hypothèse de travail.....	159
2.	Analyse de la structure primaire des transcrits du gène <i>myostatine</i> et découverte d'un nouvel allèle <i>mh</i> chez la Blonde d'Aquitaine.....	159
3.	Association génotype/phénotype.....	175
4.	Conclusion.....	181
II.	Variabilité phénotypique du développement musculaire chez la race Blonde d'Aquitaine.....	183
1.	Analyse des séquences 5' et 3' non codantes du transcrit du gène <i>myostatine</i>	187
a)	Analyse de la région 5'UTR.....	187
b)	Analyse de la région 3'UTR.....	189
2.	Identification de transcrits alternatifs.....	189
3.	Etude fonctionnelle des différentes régions 3'UTR.....	193
a)	Etude de l'activité Luciférase : Impact des 3'UTR/ SV40 late poly(A).....	193
b)	Impact des 3'UTR seuls.....	195
4.	Détection des produits de la maturation de la myostatine.....	197

a) Analyses par Western blot.....	197
b) Dosage de la myostatine bioactive dans le sérum.....	197
Discussion générale.....	203
Références Bibliographiques.....	211
Annexes.....	233
Annexe 1 : Résultats de génotypage des animaux provenant des croisements Blonde d'Aquitaine x Prim'Holstein.....	233
Annexe 2 : Séquences codantes des transcrits 1 et 2 (cf. Fig. 36).....	235
Résumé/Abstract.....	245

Index des figures

Figure 1 :	Les trois types de cellules musculaires.....	10
Figure 2 :	Anatomie du muscle squelettique et de la fibre musculaire.....	12
Figure 3 :	Structure d'un sarcomère.....	14
Figure 4 :	Schéma des mécanismes aérobie (rouge) et anaérobies (bleu) majoritairement impliqués dans la production d'ATP.....	16
Figure 5 :	Modèle du <i>clock and wavefront</i> chez le poulet.....	20
Figure 6 :	Schéma de la formation du sclérotome, dermomyotome et myotome.....	22
Figure 7 :	Processus et facteurs impliqués dans la myogénèse squelettique.....	26
Figure 8 :	Schéma des mécanismes impliqués dans la synthèse et la dégradation protéique.....	28
Figure 9 :	Photo du premier patient de Guillaume Duchenne de Boulogne diagnostiqué pour la dystrophie musculaire de Duchenne.....	30
Figure 10 :	Un cas d'hypertrophie musculaire chez l'homme.....	34
Figure 11 :	Phénotype d'hypertrophie musculaire chez quelques espèces.....	36
Figure 12 :	Le phénotype callipyge.....	42
Figure 13 :	Photos des 3 premières races bovines allaitantes Françaises.....	48
Figure 14 :	Comparaison de coupe de testicule de taureaux Holstein-Friesian (A) et Blanc Bleu Belge (B).....	50
Figure 15 :	Exemples de critères de sélection de femelles Limousine pour leurs aptitudes au vêlage.....	54
Figure 16 :	% de mortalité périnatale et de vêlage difficile en race allaitante (à partir des données de Coutard et al., 2007).....	56
Figure 17 :	Analyse de ségrégation de croisements expérimentaux dans la population Blanc Bleu Belge.....	62
Figure 18 :	Transcrits canoniques et transcrits alternatifs du gène <i>myostatine</i> chez différentes espèces.....	70
Figure 19 :	Séquence peptidique et maturation de la myostatine.....	76
Figure 20 :	Modèles de la maturation et de la sécrétion de la myostatine.....	78
Figure 21 :	Schéma des régulations post-transcriptionnelle par les miRNAs du muscle, impliqués dans la balance entre synthèse et dégradation protéique.....	84
Figure 22 :	Schéma de la voie de signalisation canonique de la myostatine.....	92
Figure 23 :	Schéma des voies de signalisations induites par la myostatine et impliquées dans l'inhibition des processus myogénique.....	94
Figure 24 :	Photos de souris déficientes pour le gène <i>myostatine</i>	100
Figure 25 :	Schéma du rôle de la myostatine sur le cycle cellulaire au cours de la myogénèse.....	102
Figure 26 :	Schéma du rôle de la myostatine sur les processus myogénique en pré et post-natal.....	104
Figure 27 :	Photos d'animaux de race Garonnaise, Quercy et Pyrénéenne.....	130

Figure 28 :	Schéma de croisement pour l'obtention de 58 animaux croisés Blonde d'Aquitaine x Prim'Holstein.....	144
Figure 29 :	Principe de la RACE.....	148
Figure 30 :	Plasmide <i>PmiR-Glo Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector</i> modifié.....	150
Figure 31 :	Animaux hypermusclé de races Blanc Bleu Belge (A) et Blonde d'Aquitaine (B).....	158
Figure 32 :	Un environnement propice à l'épissage.....	160
Figure 33 :	Des régions 5'UTR de tailles variables.....	186
Figure 34 :	Des régions 3'UTR de tailles variables.....	188
Figure 35 :	Séquence du transcrit x à partir de la fin de l'exon 3 jusqu'à sa queue poly(A)	190
Figure 36 :	Isoformes de la myostatine.....	190
Figure 37 :	Séquences 3'UTR utilisés pour l'étude fonctionnelle.....	192
Figure 38 :	Impact des séquences 3'UTR/ SV40 poly(A) sur le taux d'activité luciférase..	194
Figure 39 :	Impact des séquences 3'UTR seules.....	194
Figure 40 :	Détection des formes protéiques de la myostatine par Western blot.....	196

Index des tableaux

Tableau 1 :	Différentes appellations du phénotype hypermusclé selon le critère pris en compte et la langue.....	46
Tableau 2 :	Valorisation économique des animaux de race Blonde d'Aquitaine par rapport à la moyenne des animaux de l'ensemble des autres races (données France Agrimer).....	132
Tableau 3 :	Amorces utilisées dans Bouyer et al., 2014.....	142
Tableau 4 :	Récapitulatif des 25 variables prises en compte dans l'analyse.....	146
Tableau 5 :	Amorces utilisées pour l'amplification PCR de séquences 3'UTR de tailles variables.....	150
Tableau 6 :	Corrélations entre les variables mesurées en vif.....	174
Tableau 7 :	Effectif des génotypes selon les différents facteurs.....	176
Tableau 8 :	Résultat du GLM pour la variable P_NAIS.....	176
Tableau 9 :	Résultats des GLM sur 24 variables quantitatives.....	178
Tableau 10 :	Valeurs moyennes des variables pour chacun des génotypes.....	180
Tableau 11 :	Présence ou absence des transcrits avec des 3'UTR de tailles variables chez les animaux étudiés.....	188
Tableau 12 :	Concentration en myostatine bioactive dans du sérum d'animaux de races Limousine, Blonde d'Aquitaine et Salers.....	198

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Le tissu musculaire participe aux fonctions vitales de l'organisme comme le mouvement et la locomotion (muscle squelettique), les battements du cœur et la circulation sanguine (muscle cardiaque), la thermorégulation, la digestion et la respiration (muscle lisse). Parmi les trois types de tissus musculaires, le muscle squelettique est le plus abondant du corps. Par des mécanismes moléculaires stricts et complexes, mettant en jeu un métabolisme énergétique essentiel, il assure des cycles de contraction et relâchement pour garantir ses fonctions motrices. Après leur mise en place au cours du développement embryonnaire et fœtal durant la myogenèse, la croissance des fibres musculaires du muscle squelettique après la naissance est dépendante d'une balance entre synthèse et dégradation protéique qui, elle-même est dépendante des activités physiques et du régime alimentaire de l'individu. Néanmoins, des défauts peuvent apparaître au cours de la formation et de la croissance du muscle squelettique, entraînant ainsi l'apparition de pathologies. Une multitude de myopathies ont été répertoriées. Elles peuvent présenter un phénotype atrophique, dystrophique ou hypertrophique. Elles ont pour la plupart une origine génétique, bien que la malnutrition, la prise de glucocorticoïdes, l'immobilisation, le cancer et le vieillissement soient également liés à l'apparition de myopathies. La recherche fondamentale dans ce domaine est indispensable pour trouver des traitements afin de soigner ou du moins rendre plus facile la vie des patients atteints de ces pathologies.

Le muscle squelettique n'est pas nécessaire à l'homme uniquement en tant qu'organe fonctionnel du corps, mais il est également nécessaire pour son régime alimentaire. En effet, depuis des siècles, les animaux de rentes comme les animaux de races bovines sont sélectionnés pour les qualités nutritionnelles et organoleptiques de leur viande ainsi que leurs qualités d'élevages. La sélection d'animaux produisant une viande de qualité, dans de bonnes proportions avec un taux de persillage mesuré est réalisée depuis des siècles par les éleveurs rien que par l'observation de la conformation de l'animal en tenant compte de critères morphologiques précis. L'essor de la génétique et les études d'association entre la présence d'un allèle d'un gène chez un animal et l'apparition d'un caractère morphologique d'intérêt sur ce même animal ont permis la mise en place d'outils génétiques permettant la sélection d'animaux possédant les caractéristiques d'intérêts, et cela, à des stades précoces de leur développement. Bien que ces tests génétiques précoces soient coûteux, ils permettent aux éleveurs de faire des économies

considérables sur l'élevage de leurs animaux (économie de place, de nourriture, d'antibiotiques). La recherche de l'origine génétique de l'apparition de caractères d'intérêts est donc un enjeu capital en agronomie pour la mise en place de tests génétiques de sélections d'animaux présentant les caractères d'intérêts.

En 1997, un gène majeur du développement musculaire a été identifié, c'est le gène *myostatine*. Il s'agit d'un gène dont le produit agit comme un régulateur négatif du développement musculaire et dans lequel des mutations pertes de fonction ont été identifiées comme étant impliquées dans l'apparition d'un phénotype d'hypertrophie musculaire chez l'homme et d'autres espèces comme le chien, le mouton et la vache. Chez le bovin, ce phénotype est caractérisé par un meilleur rendement viande/carcasse et une plus faible proportion de masse grasse. Néanmoins, il est aussi caractérisé par de moins bonnes qualités d'élevages (augmentation de pathologies cardiaques et respiratoires, augmentation des difficultés de vêlage et du taux de mortalité des veaux à la naissance). Les effets de ces mutations sont dose-dépendants, les animaux homozygotes mutants présentent un phénotype plus fort que les animaux hétérozygotes. La sélection d'animaux hétérozygotes de phénotype intermédiaire, par la mise en place de tests génétiques de sélection, est donc un atout à utiliser.

Des mutations causales ont déjà été identifiées pour certaines races bovines, c'est le cas de la race Blanc Bleu Belge, de la Piémontaise et de la Charolaise mais pas de la race Blonde d'Aquitaine. L'identification de la mutation à l'origine de l'apparition du phénotype hypermusclé en race Blonde d'Aquitaine, 3^{ème} race à viande française, et la mise en place d'un test génétique de sélection participerait à un essor de l'intérêt des éleveurs et des consommateurs pour cette race et par là-même à l'essor de cette race à l'international.

Dans ce contexte, mon travail de thèse dans l'UMR 1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, s'intègre dans la compréhension globale du déterminisme génétique des caractéristiques musculaires chez le bovin en se focalisant sur la race Blonde d'Aquitaine. Au côté du Pr. Ahmad Oulmouden, mon projet a été de réaliser une analyse fine du gène *myostatine* dans le but de déterminer son implication potentielle dans l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire en race Blonde d'Aquitaine par l'identification d'éventuelles mutations effectives.

Au cours de ma thèse nous avons pu identifier cette mutation effective en race Blonde d'Aquitaine et mon travail a été divisé en deux parties. D'une part, l'analyse de la séquence codante du gène *myostatine* après rétrotranscription des transcrits provenant d'échantillons musculaires d'animaux hypermusclés de race Blonde d'Aquitaine ainsi que l'analyse des séquences introniques de ce gène nous ont permis de caractériser cette mutation. Les études qui ont suivies ont permis de comprendre une partie du mécanisme moléculaire associant cette mutation à l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire, et d'établir une corrélation entre la présence de la mutation et l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire en race Blonde d'Aquitaine. D'autre part, l'analyse des séquences régulatrices non codantes 5' et 3'UTR ainsi que l'analyse du taux de transcription du gène *myostatine* selon les animaux participant à la compréhension des mécanismes moléculaires associés à la forte variabilité du phénotype d'hypertrophie musculaire observée en race Blonde d'Aquitaine.

Ces résultats vous seront présentés et discutés au cours de ce manuscrit, sous la forme d'une publication pour la première partie et sous la forme de résultats complémentaires pour la seconde partie. Mais avant de traiter les résultats, laissez-moi-vous faire un état des lieux des connaissances concernant i) le muscle squelettique, sa mise en place au cours du développement, les pathologies associés et l'étude morphologique et génétique du phénotype d'hypertrophie musculaire bovin, ii) l'identification du gène *myostatine* et de ses fonctions et iii) les intérêts agro-alimentaires de la race hypermusclée Blonde d'Aquitaine.

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction Bibliographique

I. Le développement musculaire

1. Le muscle

a) Les différents types de muscle

Les cellules musculaires sont le moteur du corps des vertébrés. Par des contractions (volontaires ou involontaires selon le type cellulaire), le tissu musculaire participe aux fonctions vitales de l'organisme comme le mouvement et la locomotion, les battements du cœur et la circulation sanguine, la thermorégulation, la digestion et la respiration. Chez les vertébrés, il existe trois types de tissus musculaires avec des fonctions spécialisées.

Le muscle lisse

Au cours de l'évolution, le muscle lisse a été la première forme musculaire à se développer. Il est retrouvé chez toutes les espèces du règne animal. Chez les vertébrés, le muscle lisse est présent dans les organes internes comme les vaisseaux sanguins, les tractus gastro-intestinaux et respiratoires. Il joue aussi un rôle dans la contraction de l'iris oculaire lorsque la lumière est intense et dans l'érection des poils lors de la thermorégulation. Enfin, il permet l'expulsion de vésicules de certaines glandes comme les glandes salivaires ou les glandes sudoripares.

Le tissu musculaire lisse est constitué de cellules mononuclées longues en forme de fuseaux, organisées en feuillets (Fig. 1A). C'est un système contractile involontaire, géré par le système nerveux autonome. Dans certains tissus, les cellules ne se contractent que lorsqu'elles sont stimulées par un nerf. Lors d'une stimulation nerveuse, toutes les cellules du feuillet se contractent en même temps. En revanche, dans la paroi intestinale, les cellules musculaires peuvent s'autostimuler et générer elles-mêmes des impulsions électriques entraînant la contraction musculaire. Dans ce cas, les nerfs régulent la contraction musculaire plutôt qu'ils ne la déclenchent (Johnson et al., 2011).

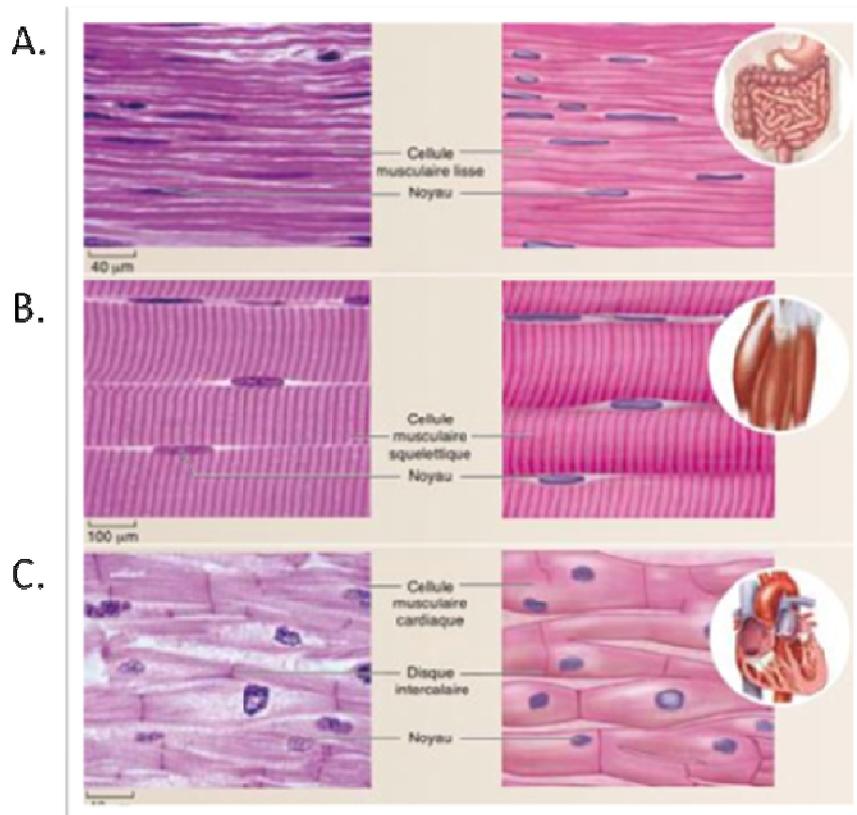


Figure 1 : Les trois types de cellules musculaires.

Coupes longitudinales des trois types de tissus musculaires observées au microscope optique après coloration hématoxyline/éosine (à gauche) et avec pour chaque un dessin leur correspondant (à droite). **A**, Les cellules musculaires lisses sont des cellules longues en forme de fuseaux, mononucléées, et organisées en feuillet. **B**, Les cellules du muscle squelettique sont striées, plurinucléées et allongées de façon parallèle. **C**, Les cellules cardiaques sont striées, mononucléées et forment une seule unité fonctionnelle grâce aux disques intercalaires. (Johnson et al., 2011).

Le muscle cardiaque

Le tissu musculaire cardiaque forme une pompe musculaire qui permet la propulsion du sang à travers le système circulatoire.

Il est constitué de cellules striées, mononuclées et interconnectées par des jonctions communicantes appelées les disques intercalaires (Fig. 1C). Ces jonctions communicantes permettent aux cellules cardiaques de former une seule unité fonctionnelle, avec le passage de petites substances et d'ions d'une cellule à l'autre.

Comme pour le muscle lisse, le muscle cardiaque est en partie sous le contrôle du système nerveux autonome. Même si certaines cellules cardiaques spécialisées peuvent générer des impulsions électriques, le rythme de ces impulsions est en plus régulé par le système nerveux autonome. Ces impulsions se distribuent ensuite à travers les jonctions communicantes de cellule à cellule, déclenchant la contraction de toutes les cellules du myocarde (Johnson et al., 2011).

Le muscle squelettique

Le muscle squelettique donne au corps des vertébrés sa capacité de mouvement. Il permet aussi la locution, la locomotion et le maintien de l'organisme. Les muscles squelettiques sont généralement attachés aux os par des tendons, ce qui permet à la contraction musculaire le mouvement du membre associé au muscle en contraction.

Le tissu musculaire squelettique est composé de cellules striées, plurinuclées, très longues et nombreuses, associées de façon parallèle, ce sont les fibres musculaires (Fig. 1B). La cellule musculaire est aussi appelée fibre musculaire par rapport à ses propriétés spécifiques. Les fibres musculaires sont soumises à un contrôle volontaire par le système nerveux somatique. Il contrôle la puissance de contraction des muscles squelettiques en contrôlant la puissance de stimulation des neurones moteurs sur ces fibres. Après stimulation, les fibres musculaires se contractent grâce à un mécanisme de contraction/relâchement associé à des structures appelées myofibrilles qui contiennent des faisceaux très ordonnés de myofilaments d'actine et de myosine.

La contraction du muscle squelettique débute à partir de mécanismes localisés à l'échelle des myofilaments d'actine et de myosine, et se répercute à l'échelle du muscle pour permettre son mouvement. Ainsi, c'est tout un système strictement organisé qui est impliqué dans la contraction du muscle squelettique (Johnson et al., 2011).

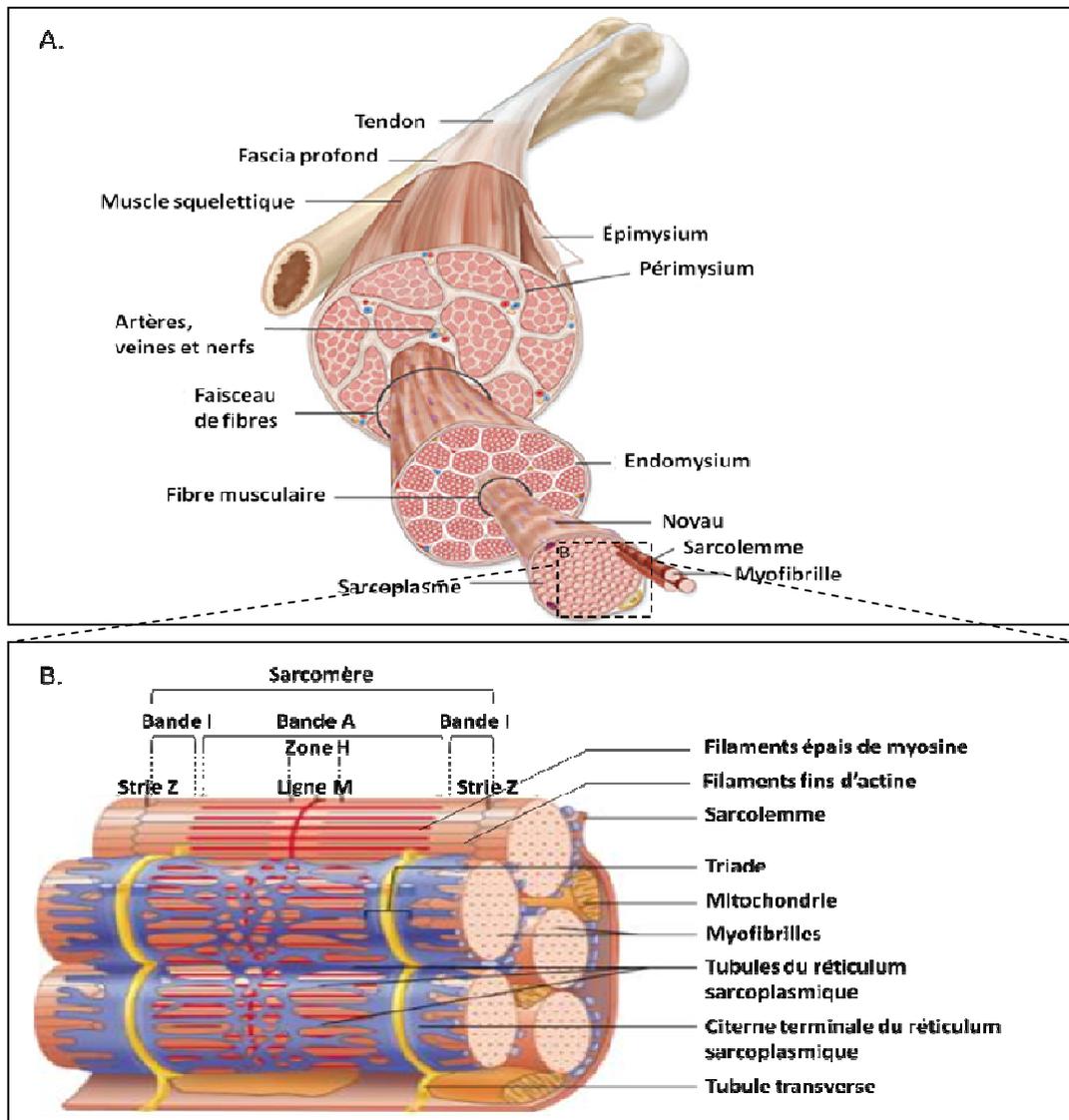


Figure 2 : Anatomie du muscle squelettique et de la fibre musculaire.

A. Organisation du muscle en quatre niveaux majeurs : le muscle qui est constitué de faisceaux de fibres assemblés entre eux par le périmysium, les faisceaux de fibres qui contiennent plusieurs fibres musculaires (unités cellulaires du muscle) assemblées entre-elles par l'endomysium, les fibrilles musculaires qui contiennent plusieurs myofibrilles, et qui sont elles-mêmes constituées de répétition de structures appelées sarcomères, les unités contractiles du muscle. **B.** Organisation interne d'une fibre musculaire. Le sarcolemme est la membrane plasmique des cellules musculaires. Ses invaginations à l'intérieur de la fibre sous forme de tubules transverses, permettent la propagation du signal de dépolarisation membranaire suite à un influx nerveux, ce qui influe sur la citerne terminale et permet la libération des ions Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique et la contraction musculaire (Modifié de Johnson et al., 2011).

b) Organisation du muscle squelettique des vertébrés

Les cellules du muscle squelettique font partie des cellules les plus hautement organisées de l'organisme (Fig. 2A). Le muscle squelettique est associé au squelette par les tendons, tissus conjonctifs constitués de fibres de collagènes. Dans le prolongement des tendons, le muscle squelettique est entouré d'autres tissus conjonctifs, le fascia profond puis l'épimysium. L'épimysium recouvre lui-même un ensemble de 4 à 20 faisceaux de fibres musculaires entourées par le péri-mysium. Chaque faisceau de fibres musculaires contient de 20 à 80 fibres musculaires elles-mêmes entourées par l'endomysium. Une fibre musculaire contient une centaine de noyaux, est de forme cylindrique de 10 à 100 μ m d'épaisseur et de plus de 100mm de long. Enfin, chaque fibre musculaire contient une centaine de filaments cylindriques, les myofibrilles, associées en parallèle entre elles par le réticulum sarcoplasmique (sarcoplasme) et entourée par le sarcolemme. Chaque myofibrille est constituée d'une répétition de sarcomères, les unités contractiles du muscle, délimitées par les stries Z, tout le long de la myofibrille (Fig. 2B). Enfin, chaque sarcomère est constitué de filaments minces d'actine et de filaments épais de myosine disposés en quinconce (Fig. 2B). Les filaments d'actine et de myosine sont présents dans tous les types cellulaires eucaryotes mais en plus grande quantité et de façon plus organisée dans les cellules musculaires. Ils sont indispensables à la contraction musculaire (Johnson et al., 2011; Karp, 2010).

c) Les sarcomères, unités contractiles du muscle

Chaque sarcomère est délimité au sein de la myofibrille par des stries Z. Elles apparaissent très foncées au microscope électronique (Fig. 3B). Entre chaque strie Z sont disposés linéairement le long de la myofibrille les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine, en quinconce. De l'extrémité des sarcomères vers leur centre, plusieurs zones ont été définies (Fig. 3). Les bandes I, présentes à chaque extrémité du sarcomère et faiblement colorées en microscopie électronique, constituent la partie du sarcomère majoritairement composée de filaments fins d'actine. La bande A, plus colorée, constitue la partie du sarcomère composée à la fois de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine. La zone H, faiblement colorée au centre du sarcomère, est majoritairement constituée de filaments épais de myosine. Enfin, la

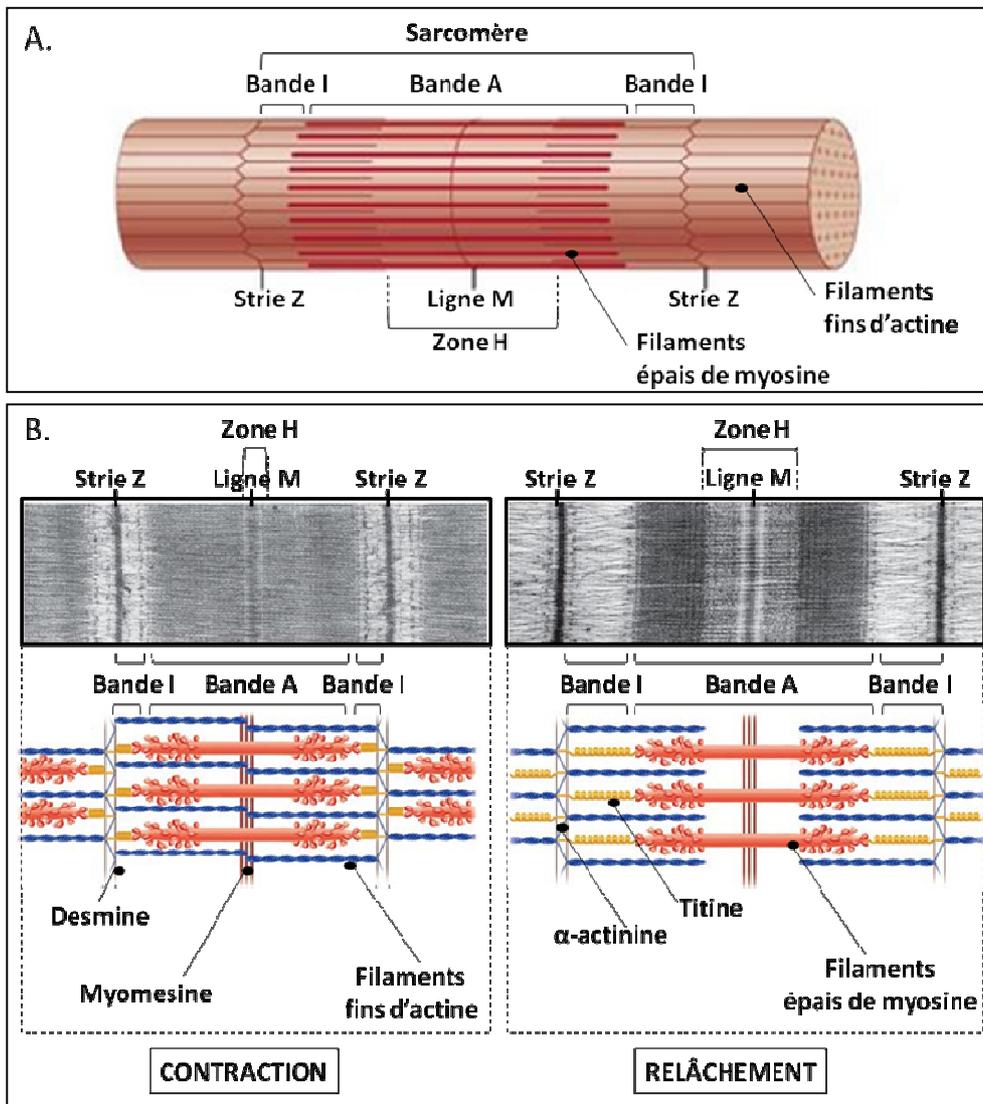


Figure 3 : Structure d'un sarcomère.

A, Représentation schématique d'un sarcomère. **B**, Observation au microscope électronique et représentation schématique d'un sarcomère en contraction (à gauche) et en relâchement (à droite). Le sarcomère est constitué d'un enchevêtrement de filaments épais de myosine (rouge) et de filaments fins d'actine (bleu) disposés en quinconce. Les stries Z, constituées de desmine et d' α -actinine, sont très foncées au microscope électronique et délimitent le sarcomère. La ligne M, également foncé au microscope est au centre du sarcomère et est constitué de myomesine. La titine (jaune) est présente d'une strie Z à une autre au sein du sarcomère. La bande A est constituée à la fois de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine. Les bandes I, faiblement colorées, sont constituées de filaments fins d'actine et de titine. La zone H, faiblement colorée, est constituée de filaments épais de myosine. Au moment de la contraction musculaire, les filaments épais de myosine glissent le long des filaments fins d'actine. La zone H et les bandes I se réduisent (Modifié de Johnson et al., 2011).

zone H est elle-même constituée d'une ligne M intensément colorée en microscopie électronique (Fig. 3).

D'autres protéines impliquées dans la contraction musculaire sont présentes au sein des sarcomères (Fig. 3 ; Schiaffino and Reggiani, 2011). Pour ne citer que les plus connues, sur les filaments fins d'actine sont retrouvées associées la tropomyosine et la troponine qui ont des rôles importants dans la contraction musculaire en permettant aux filaments d'actine un changement de conformation entre contraction et relâchement musculaire. Alignées le long des filaments fins d'actine, on retrouve des molécules de nébuline qui contrôleraient le nombre de monomères d'actine pouvant s'assembler en un filament mince. Des molécules de titine, présentes dès la ligne M et tout le long des filaments épais de myosine puis des filaments fins d'actine jusqu'à la strie Z, permettent une association entre ces deux types de filaments (Keller, 1995). Ces molécules de titine sont élastiques et jouent un rôle important lors de la contraction musculaire en maintenant les filaments épais de myosine au centre du sarcomère. Enfin, l' α -actinine et la desmine sont situées le long de la strie Z et la myomesine le long de la bande M, de façon perpendiculaire aux myofilaments.

d) Mécanismes de contraction musculaire

La contraction musculaire nécessite une communication nerveuse. Les fibres musculaires sont reliées au système nerveux par des neurones moteurs. Un neurone moteur (ou motoneurone) peut être relié à plusieurs fibres musculaires grâce à ses différentes branches axonales, l'ensemble étant désigné comme une unité motrice. Après stimulation nerveuse, le neurone moteur envoie un influx nerveux le long de ses branches axonales jusqu'au point de contact entre la synapse et la fibre musculaire, au niveau de la jonction musculaire, ce qui permet la libération d'un neuromédiateur, l'acétylcholine (ACh). L'ACh permet l'entrée dans la cellule d'ions Na^+ ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique qui se propage à l'intérieur de la fibre musculaire jusqu'au réticulum sarcoplasmique grâce aux tubules transverses (Fig. 2B). En réponse à ce signal, le réticulum sarcoplasmique libère des ions Ca^{2+} dans le cytoplasme. Au repos, les molécules de troponine et de tropomyosine sont dans une conformation telle qu'elles bloquent la fixation des molécules d'actine à la myosine. En présence d'une quantité suffisante de calcium, l'interaction entre le calcium et la troponine entraîne un déplacement de la tropomyosine, ce qui libère le site de liaison entre le filament d'actine et les molécules de

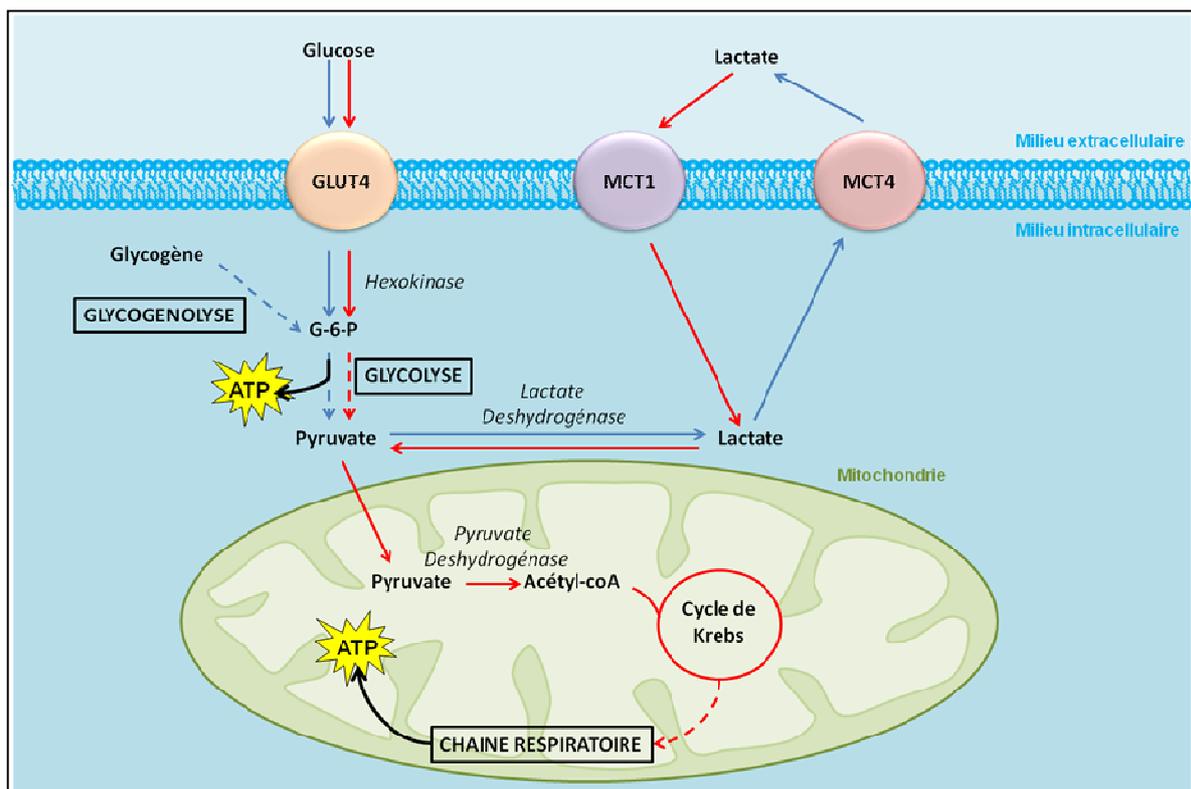


Figure 4 : Schéma des mécanismes aérobies (rouge) et anaérobies (bleu) majoritairement impliqués dans la production d'ATP.

L'assimilation du glucose dans la cellule permet la production d'ATP grâce à la glycolyse et entraîne la formation de pyruvate. En anaérobie, le pyruvate sera transformé en lactate par la lactate déshydrogénase, puis éliminé de la cellule ou réutilisé en aérobie. En aérobie, le pyruvate est transformé en acétyl-coA par la pyruvate déshydrogénase pour servir de réactif au cycle de Krebs. Les éléments produits au cours du cycle de Krebs seront utilisés pour le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale qui permet la production d'ATP. ATP : Adénosine triphosphate ; GLUT4 : *Glucose Transporter 4* ; G-6-P : Glucose-6-Phosphate ; MCT1 et MCT4 : *Monocarboxylic Acid Transporter 1 & 4* (Modifié de Schiaffino and Reggiani, 2011).

myosine. Par l'hydrolyse de molécules d'ATP en ADP+Pi, les molécules de myosine, une fois fixées au filament d'actine, glisse le long de ces filaments, entraînant ainsi la contraction musculaire (Huxley, 1969, 1985; Jiang and Sheetz, 1994; Rayment et al., 1993). En microscopie électronique, on observe un rapprochement des filaments de myosine avec les filaments d'actine, un rapprochement des bandes A et un rétrécissement des bandes I et H (Fig. 3B ; Huxley, 1969; Huxley and Hanson, 1954; Huxley and Niedergerke, 1954). Enfin, lorsque la stimulation nerveuse cesse, les ions calciques sont éliminés du cytosol par les canaux Ca^{2+} -ATPase. Les ions calciques liés à la troponine sont également retirés et la troponine et la tropomyosine se remettent dans une conformation telle que la myosine ne peut plus se lier aux filaments d'actine (Johnson et al., 2011; Karp, 2010).

e) Différents types de fibre

Les cellules musculaires doivent en permanence maintenir un certain stock d'ATP pour subvenir aux besoins en ATP nécessaires à la contraction musculaire. Pour cela, plusieurs mécanismes générant des molécules d'ATP existent au sein des cellules musculaires (Fig. 4).

Les cellules musculaires possèdent une réserve de créatine phosphate. Cette protéine est capable, avec une molécule d'ADP, de générer de l'ATP et de la créatine et permet de préserver un taux assez élevé d'ATP dans la cellule pendant 15 secondes.

Ensuite, les cellules musculaires génèrent, par la glycolyse, deux molécules d'ATP et deux molécules de pyruvate par molécule de glucose métabolisée (Fig. 4). En aérobie, une molécule de pyruvate est métabolisée en acétyl-coA par la pyruvate déshydrogénase. Au cours du cycle de Krebs, cet acétyl-coA va être métabolisé afin de générer des molécules et des électrons nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire présente au sein du réseau mitochondrial, et ainsi générer des molécules d'ATP (Fig. 4). En anaérobie, se produit le processus de fermentation lactique où le pyruvate est métabolisé en lactate par la lactate déshydrogénase (Fig. 4). Ce lactate peut ensuite soit être éliminé par le foie soit être réutilisé pour reformer du pyruvate. Ainsi, plusieurs types de fibres musculaires ont été décrits en fonction de leur capacité lente ou rapide à produire de l'ATP mais aussi en fonction du métabolisme en aérobie ou anaérobie utilisé.

Les fibres de type I sont dites à contraction lente (40 à 100ms) avec un métabolisme oxydatif. Elles sont riches en mitochondries, en enzymes oxydatives et sont entourées d'un réseau

capillaire sanguin dense. Grâce à ce réseau capillaire, la myoglobine, de couleur rouge, permet l'apport rapide de l'oxygène aux fibres musculaires de type I, aussi appelées fibres rouges.

Les fibres de type IIB sont dites à contraction rapide (14 à 40ms) avec un métabolisme glycolytique. Elles ont moins de capillaires sanguins, très peu de mitochondries et ne produisent que très peu d'ATP en respiration aérobie. En revanche, elles ont un stock plus important de glycogène et produisent majoritairement leur ATP en anaérobiose. Même si la glycolyse ne permet de produire que 5% de l'ATP qui pourrait être obtenu par les réactions oxydatives, c'est un processus bien plus rapide que le cycle de Krebs et le transport d'électron, ce qui explique que ces fibres soient rapides. Ces fibres sont aussi appelées les fibres blanches.

Les fibres à contraction lente permettent un exercice endurant avec une meilleure résistance à la fatigue tandis que les fibres à contraction rapide permettent de répondre à un exercice physique intense de courte durée.

Il existe aussi un type intermédiaire de fibres musculaires, les fibres de type IIA. Elles sont de contraction rapide. Riches en mitochondries, elles répondent au métabolisme oxydatif, mais aussi au métabolisme glycolytique. Ainsi, elles permettent une résistance intermédiaire à la fatigue. Enfin, des fibres de types IIX et IID ont également été identifiées. La fibre de type IIX serait intermédiaire entre les fibres de type IIA et IIB, dans sa vitesse de contraction musculaire et dans sa fatigabilité suite à la contraction musculaire. En revanche, la provenance et le rôle de la fibre IID ne sont actuellement pas clairs (Schiaffino and Reggiani, 2011; Schiaffino et al., 1989).

La quantité de chacune de ces fibres varie selon le muscle. Par exemple, un muscle du dos impliqué dans la posture présente une proportion plus élevée de fibres à contraction lente. En revanche, le muscle du bras qui permet de soulever et lancer des objets présente une proportion plus élevée de fibres à contraction rapide. Le rapport d'un type de fibre à un autre dans un muscle dépend du fond génétique de l'individu mais également de la pratique sportive effectuée. D'une part, selon l'espèce, un même muscle peut présenter une proportion différente des deux types de fibres. Chez la souris et le rat par exemple, le diaphragme présente une proportion plus élevée de fibres à contraction rapide alors que chez les espèces comme *bos taurus*, le diaphragme est majoritairement constitué de fibres à contraction lente (Schiaffino et al., 1989). D'autre part, la pratique sportive courte mais intense (sprint, haltérophilie), peut entraîner une proportion plus élevée de fibres à contraction rapide et une hypertrophie musculaire, c'est-à-dire, une

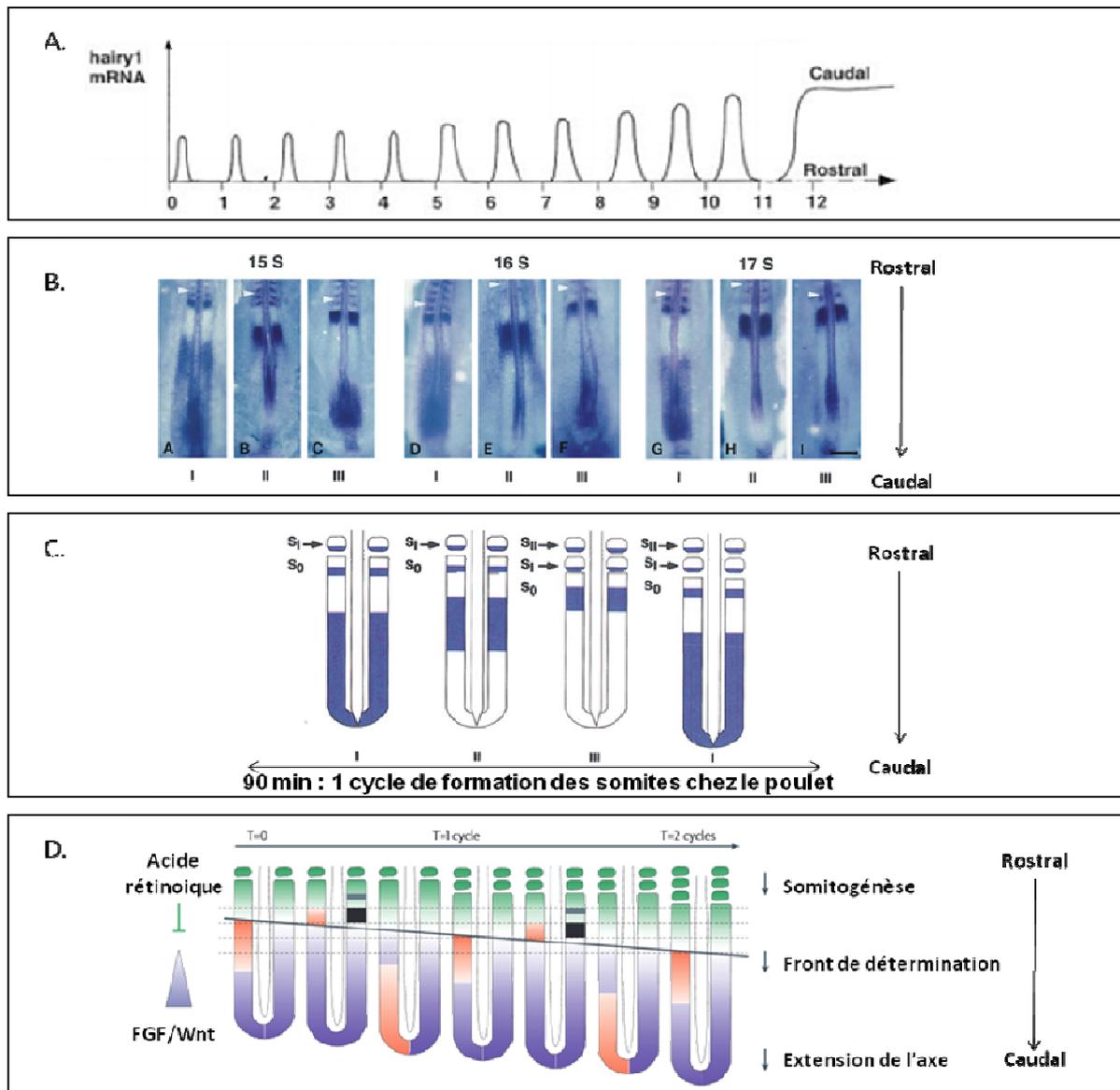


Figure 5 : Modèle du *clock and wavefront* chez le poulet.

A, Expression cyclique d'*hairy1* dans le mésoderme présomitique selon l'axe caudo-rostral. **B,** Profil d'expression d'*hairy1* par hybridation *in situ* dans un embryon de poulet aux stades 15, 16 et 17 somites. **C,** Représentation schématique de la formation des somites en fonction de l'expression d'*hairy1* (bleu) selon l'axe caudo-rostral. Un cycle (90 min chez le poulet) est divisé en trois stades I, II et III de façon corrélée avec l'expression d'*hairy1*. **D,** Représentation schématique du modèle *clock and wavefront* de segmentation des somites. L'expression cyclique d'*hairy1* est indiquée en rouge. Les gradients antagonistes d'expressions de FGF/Wnt selon l'axe caudo-rostral et de l'acide rétinolique selon l'axe rostro-caudal, avec l'expression de *Mesp2* (carré noir) positionnent le front de détermination (ligne noire), le long du mésoderme présomitique. FGF: *Fibroblast growth factor*, *Mesp2*: *Mesoderm posterior protein 2* (Dequéant and Pourquié, 2008; 2008; Palmeirim et al., 1997).

augmentation de la taille des fibres musculaires (Andersen et al., 2000; Johnson et al., 2011; Karp, 2010; Schiaffino and Reggiani, 2011). Enfin, selon le type d'exercice, intense et puissant ou peu intense mais long, ce seront les motoneurones innervant les fibres rapides ou les motoneurones innervant les fibres lentes qui seront recrutés.

La formation de ces fibres s'effectue au cours du développement musculaire embryonnaire et fœtal, à partir d'un processus strict en plusieurs étapes appelé la myogenèse.

2. La myogenèse

Au cours du développement, une programmation génétique précise détermine la différenciation des cellules musculaires et la formation des muscles.

Le mésoderme paraxial présomitique est à l'origine des somites, structures épithéliales qui sont localisées à proximité et de part et d'autre du tube neural, le long de l'axe antéro-postérieur (ou rostrocaudal) du corps. Ils sont formés selon la théorie du « *clock and wavefront* » qui consiste en des alternances d'états permissifs ou non à la génération des somites, comme un mécanisme oscillatoire intrinsèque au mésoderme présomitique (Cooke and Zeeman, 1976). Ce mécanisme oscillatoire serait dû à un gène cible effecteur de notch, *hairy1* (Palmeirim et al., 1997), dont le produit (Fig. 5A et B) est exprimé par vagues périodiques suivant l'axe caudo-rostral (postéro-antérieur). Une à une les somites se forment (toutes les 90 min chez le poulet et toutes les 2 h chez la souris) de part et d'autre du tube neural (Fig. 5B et C), suivant un front de détermination (Fig. D) qui se déplace le long de l'axe rostrocaudal (antéro-postérieur).

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent ce processus oscillatoire ainsi que l'expression périodique de *hairy1* sont peu connus. Néanmoins, certaines protéines impliquées dans ce mécanisme et ayant la capacité d'être exprimées cycliquement ont pu être identifiées. La glycosyltransférase *Lunatic Fringe* (Lfng) et les facteurs de transcription de la famille des *Enhancer of split* (*Hes*, *Hes1* et *Hes7*), sont aussi exprimés de façon périodique dans le mésoderme présomitique. Ces protéines sont capables d'inhiber la voie de signalisation de notch et l'expression de *hairy1*. Le turnover rapide de ces protéines semble être à l'origine de cet effet transitoire et périodique (Bessho and Kageyama, 2003; Dale et al., 2003). La position du front de détermination serait régulée par deux gradients antagonistes impliquant les protéines Wnt3a, FGF8 et l'acide rétinoïque (Fig. 5D). Wnt3a et FGF8, exprimés selon un gradient caudo-rostral

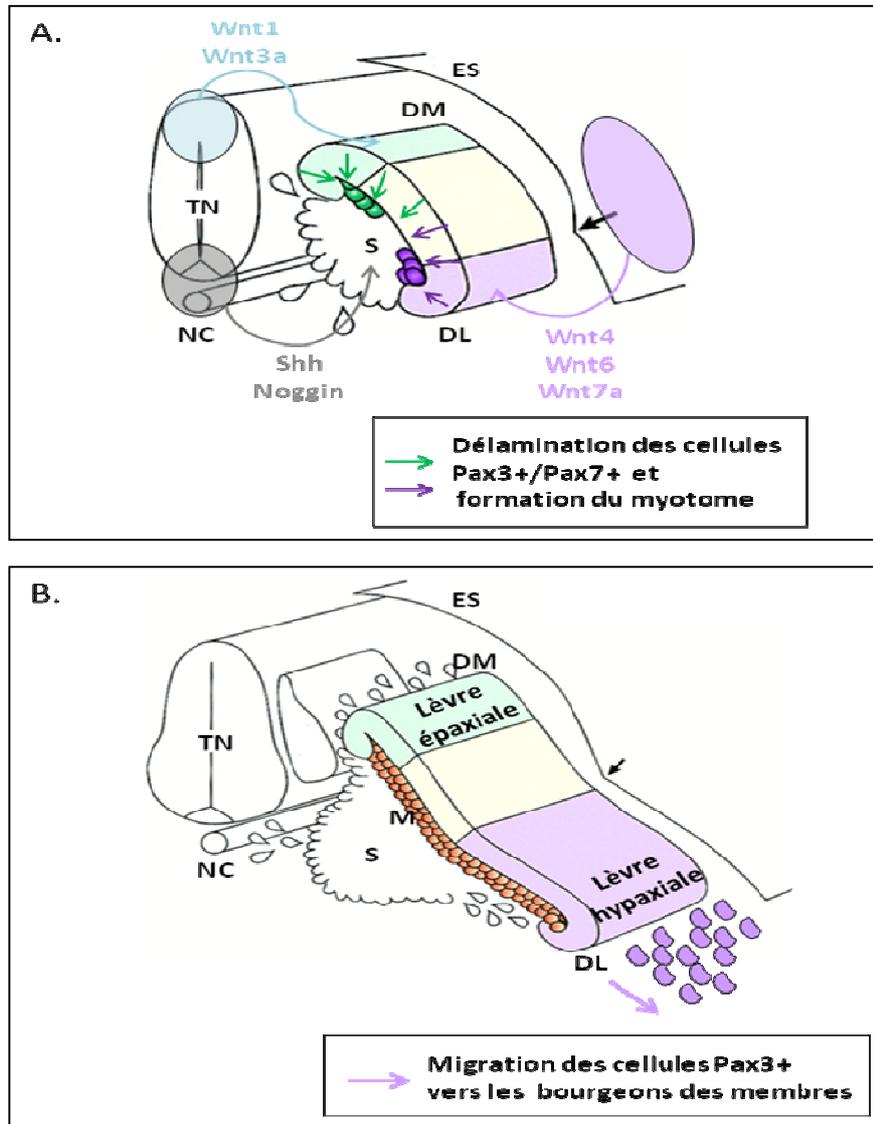


Figure 6 : Schéma de la formation du sclérotome, dermomyotome et myotome.

A, L'expression de Shh et Noggin dans la partie ventrale du tube neural et par la notochorde permet la différenciation du sclérotome. L'expression de Wnt1 et Wnt3a par la partie dorsale du tube neural permet la différenciation du dermomyotome médian (lèvres épaxiales). L'expression de Wnt4, Wnt6 et Wnt7a permet la différenciation du dermomyotome latéral (lèvres hypaxiales). Les cellules Pax3/Pax7+ (vert et violet foncé) se délimitent du dermomyotome et migrent vers le sclérotome pour former le myotome, et seront à l'origine de la formation des muscles du tronc. **B,** les cellules Pax3+ des lèvres hypaxiales du dermomyotome (violet clair) migrent vers les bourgeons des membres et seront à l'origine des muscles des membres, du diaphragme et de la langue. TN : Tube neural ; NC : Notochorde ; S : Sclérotome ; DM : Dermomyotome médian ; DM : Dermomyotome latéral ; M : Myotome ; ES : Ectoderme de surface ; Shh : Sonic hedgehog (modifié de Tajbakhsh and Spörle, 1998).

(postéro-antérieur), maintiennent les cellules dans un état indifférencié (Aulehla et al., 2003; Dubrulle et al., 2001). De façon antagoniste, l'acide rétinoïque, exprimé selon un gradient rostrocaudal (antéropostérieur), limite l'extension du gradient Wnt/FGF le long de l'axe caudorostral (Diez del Corral et al., 2003; Moreno and Kintner, 2004). Enfin, l'acide rétinoïque permettrait également l'activation de la transcription de *Mesp2* (*Mesoderm posterior protein 2*) au niveau du front de détermination (Fig. 5D) afin de spécifier la segmentation des somites (Moreno and Kintner, 2004).

Ensuite, les somites se régionalisent ; la partie ventrale des somites se dissocie de la partie dorsale afin de générer le sclérotome mésenchymateux, dans la partie ventrale des somites, à l'origine des os de la colonne vertébrale, du cartilage, des côtes et des méninges, et le dermomyotome, dans la partie dorso-latérale, qui est à l'origine du derme et des muscles squelettiques. Le sclérotome mésenchymateux se différencie sous l'influence du facteur de transcription Pax1 (*Paired-box 1*) produit par les cellules ventrales des somites sous le contrôle des facteurs Shh (*Sonic hedgehog*) et Noggin produits par la notochorde et la partie ventrale du tube neural (Christ et al., 2004). Le dermomyotome médian se différencie sous l'influence des facteurs Wnt1 et Wnt3a provenant de la partie dorsale du tube neural (Fig. 6A) et le dermomyotome latéral se différencie sous l'influence des facteurs Wnt4, Wnt6, Wnt7a provenant de l'ectoderme de surface (Fig. 6A ; Scaal and Christ, 2004). Ainsi, le dermomyotome lui-même se régionalise (Fig. 6) en un dermomyotome épaxial (dans sa partie médiane) et hypaxial (dans sa partie latérale). Des cellules exprimant les facteurs de transcriptions Pax3 et Pax7 vont subir une délamination, c'est-à-dire qu'elles vont se détacher du dermomyotome et migrer pour former le myotome qui est à l'origine des muscles du tronc (Fig. 6A ; Relaix et al., 2005). Par ailleurs, des cellules exprimant Pax3 vont également subir une délamination pour permettre leur migration du dermomyotome hypaxial vers les bourgeons des membres (Fig. 6B ; Tremblay et al., 1998), qui sont à l'origine des muscles des membres, du diaphragme et de la langue. Pour se détacher des somites, les cellules progénitrices expriment Pax3 et Lbx1 (*Ladybird homeobox protein homolog 1*) (Uchiyama et al., 2000) et reçoivent un signal du tissu mésenchymateux des bourgeons des membres qui expriment la protéine sécrétée HGF/SF (*Hepatocyte growth factor/Scatter factor*) (Brand-Saberi et al., 1996a). Elles reçoivent ce signal des cellules mésenchymateuses par le récepteur de HGF/SF, un récepteur à activité tyrosine kinase appelé Met (Bladt et al., 1995), dont l'expression est contrôlé par Pax3 (Epstein et al., 1996). De plus, des protéines d'adhésion cellulaire, notamment la N-cadhérine ou la fibronectine, veillent à la

bonne migration de ces cellules jusqu'à leur localisation finale (Brand-Saberi et al., 1993, 1996b).

La détermination puis la différenciation des cellules progénitrices du muscle en cellule musculaire est aussi sous le contrôle de facteurs de transcription à domaine bHLH (*basic helix-loop-helix*) appelés MRF (facteurs de régulation myogénique) : MyoD, Myf5, MRF4 et la myogénine. Les protéines bHLH forment des homo ou hétérodimères qui se lient à l'ADN au niveau d'une séquence consensus appelée boîte E (CANNTG). Une à plusieurs boîtes E peuvent être présentes dans la région promotrice des gènes cibles des MRF. Comme cette séquence est largement redondante même dans les promoteurs des gènes non cibles des MRF, il est nécessaire d'en contrôler l'utilisation. Ainsi, il a été montré que MyoD est capable de se fixer à des boîtes E avec une affinité dix fois supérieure s'il forme un complexe hétérodimérique avec E2A, une autre protéine à domaine bHLH, plutôt qu'un complexe homodimérique. Comme E2A est exprimée dans d'autres cellules que les cellules musculaires, il existe une autre famille de protéines qui permet une spécification optimale, ce sont les MEF (*Myocyte Enhancing Factors*). Les membres de la famille des MEF sont des facteurs de transcription possédant un domaine MADS (MCM1, *Agamous*, *Deficiens*, SRF) capable d'interagir avec la myogénine. Ainsi, l'action synergique de l'homodimère MEF avec l'hétérodimère MRF-E2A permettrait une expression spécifique des gènes cibles au niveau du muscle.

Sous le contrôle de Pax3 et Pax7, les cellules progénitrices vont exprimer les facteurs Myf5 et MyoD (Ott et al., 1991; Sassoon et al., 1989; Tajbakhsh et al., 1997) ce qui va permettre la détermination des cellules progénitrices vers la lignée musculaire (Fig. 7). Ces cellules exprimant Pax3 et Pax7, déterminées pour le lignage musculaire sont appelées myoblastes. Arrivés à leur localisation finale, les myoblastes vont se maintenir dans un état prolifératif. MyoD est impliqué dans l'arrêt de la prolifération des myoblastes pour entraîner leur différenciation. Des protéines effectrices du cycle cellulaire sont impliquées dans l'inhibition de MyoD. C'est notamment le cas du complexe cycline E/cdk2 qui permet la phosphorylation de MyoD, son ubiquitinylation et sa dégradation, empêchant ainsi les myoblastes d'entrer dans une voie de différenciation musculaire (Tintignac et al., 2000). De plus, des facteurs de croissance comme les FGF ou les IGF (IGF-1) sont des effecteurs de la prolifération cellulaire (Mitchell et al., 2002). La baisse d'expression de ces facteurs pro-prolifératif, ainsi que l'augmentation du

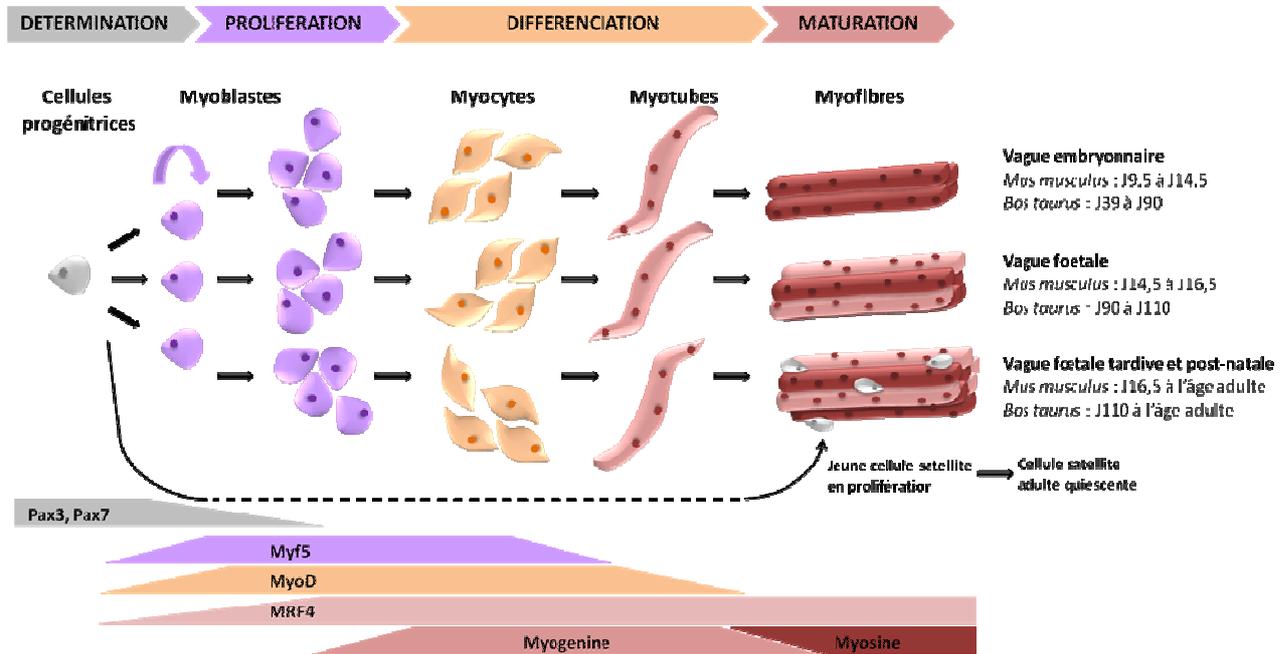


Figure 7 : Processus et facteurs impliqués dans la myogenèse squelettique.

Les cellules progénitrices Pax3/Pax7+ se déterminent en myoblastes qui vont ensuite largement proliférer et se différencier en myocytes. Les myocytes vont fusionner pour devenir des myotubes, puis des myofibres après maturation. Chacune de ces étapes est sous le contrôle d'un programme d'expression génique spécifique impliquant entre autres les facteurs de transcription de la famille des MRF (*Myogenic Regulatory Factor*). Il existe plusieurs vagues de formation des fibres musculaires. La première au cours de la vie embryonnaire permet la formation des fibres primaires. La seconde au cours de la vie foetale permet la formation des fibres secondaires. Une troisième vague permet le positionnement des cellules satellites en périphérie des fibres musculaires. Myf5 : *Myogenic factor 5* ; MyoD : *Myoblast determination protein 1* ; MRF4 : *Myogenic regulatory factor 4* ; Pax3 et Pax7 : *Paired-box 3 & 7*.

taux d'expression des inhibiteurs des cyclines et des cdk conjointement à un rétablissement du taux d'expression de MyoD, auquel s'ajoute l'expression de la myogénine, vont permettre la différenciation des myoblastes.

Au cours de la différenciation, sous l'effet des MRF et grâce aux fibres de collagène de la matrice extracellulaire, les myoblastes vont s'aligner et s'étendre (Fig. 7). Leurs membranes vont ensuite se rapprocher pour fusionner et former des cellules plurinuclées appelées myotubes (Wakelam, 1985). En d'autres termes, parmi les MRF, Myf5 et MyoD sont essentiels dans la détermination des cellules progénitrices dans la lignée musculaire mais aussi dans la différenciation des myoblastes en myotubes (Fig.7 ; Tajbakhsh et al., 1997). La myogénine est indispensable pour la fusion cellulaire en myotube (Fig. 7 ; Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993) et MRF4, également nécessaire à la détermination et à la différenciation des cellules musculaires, a plutôt un rôle redondant afin de maintenir les cellules dans un état de différenciation (Fig. 7 ; Kassar-Duchossoy et al., 2004). Ces myotubes vont ensuite subir une étape de maturation au cours de laquelle leurs noyaux vont être dirigés vers la membrane plasmique, pour devenir des fibres musculaires (Fig. 7). Il est à noter qu'il existe des inhibiteurs de ces processus de différenciation musculaire. C'est le cas de la myostatine qui est un régulateur négatif du développement et de la croissance musculaire en agissant à la fois sur la prolifération et la différenciation cellulaire mais aussi sur la synthèse protéique (McPherron et al., 1997).

Il existe deux vagues de formation des fibres musculaires (Fig. 7). La première vague, aussi appelée vague de fusion primaire, consiste en la fusion des myoblastes en myotubes. Elle permet la formation des fibres primaires et apparaît entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour de gestation chez la souris et à partir du 30^{ème} jour chez le bovin (Fig. 7 ; Duris et al., 1999). La deuxième vague, aussi appelée vague de fusion secondaire, consiste en la fusion des myoblastes entre eux ou la fusion des myoblastes avec des myotubes préexistants. Elle permet la formation des fibres secondaires et apparaît entre le 14^{ème} jour et le 17^{ème} jour de gestation chez la souris et dès le 90^{ème} jour chez le bovin (Fig. 7). Le nombre de fibres musculaires est donc déterminé dès les stades précoces du développement. Au cours de la gestation ou après la naissance, les fibres de types I peuvent être converties en fibres de types II et inversement selon la nature du muscle. Enfin, après le 17^{ème} jour chez la souris et après le 110^{ème} jour chez le bovin, des cellules de réserves en quiescence appelées cellules satellites (Mauro, 1961) se positionnent en périphérie

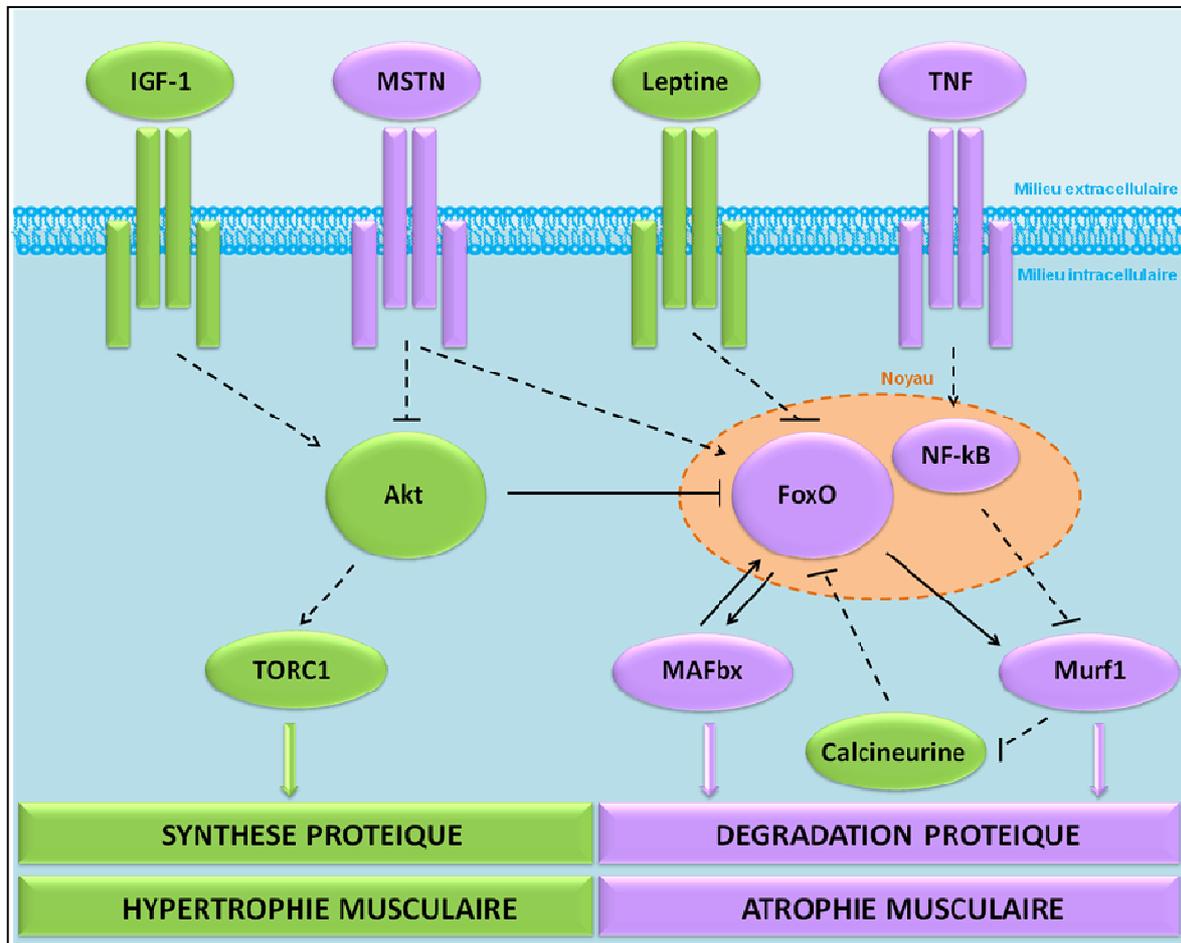


Figure 8 : Schéma des mécanismes impliqués dans la synthèse et la dégradation protéique.

Akt et FoxO sont les facteurs centraux de la balance entre synthèse et dégradation protéique. Akt permet l'activation du complexe TORC1 (mTOR/RAPTOR) qui module positivement la synthèse protéique tandis que FoxO permet l'activation des E3 ubiquitine ligase MAFbx et MuRF1 qui modulent positivement la dégradation protéique. Akt est activé par la voie d'IGF-1 et peut être inhibé par la voie de la myostatine. FoxO est activé par la voie de la myostatine et peut être inhibé par Akt, la voie de la leptine et la calcineurine. MuRF1 est capable d'inhiber la calcineurine et est lui-même inhibé par NF-kB (modifié de Braun and Goutel, 2011). MSTN : *myostatin* ; Akt : *Protein kinase B* ; FoxO : *Forkhead box protein O* ; IGF-1 : *Insuline-like growth factor 1* ; MAFbx : *Muscle atrophy F-box* ; MuRF1 : *Muscle RING-finger protein 1* ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; RAPTOR : *Regulatory-associated protein of mTOR*.

des fibres musculaires (Fig. 7). Ces cellules particulières encore pluripotentes, considérées comme des cellules souches musculaires, jouent un rôle dans la croissance des fibres musculaires au début de la vie et dans la régénération du tissu musculaire en cas de lésion tout au long de la vie. Néanmoins, le taux de ces cellules satellites diminue avec l'âge ce qui peut entraîner des pathologies musculaires comme la sarcopénie.

3. Variabilité phénotypique du développement du muscle squelettique

a) Atrophie et hypertrophie musculaire : la balance entre synthèse et dégradation protéique

Outre le nombre de fibres musculaires qui est déterminé durant les stades précoces du développement, la croissance musculaire est aussi contrôlée par une balance entre synthèse et dégradation protéique influant sur le diamètre de la fibre musculaire au cours du développement et de la vie adulte.

La protéine Akt et les protéines de la famille FoxO en sont les acteurs majeurs.

L'activation des protéines FoxO permet l'activation des E3 ubiquitines ligases, MuRF-1 et MAFbx impliquées dans la dégradation protéique qui engendre une atrophie musculaire (Fig. 8). À l'inverse, l'activation d'Akt va permettre l'inhibition de FoxO et l'activation du complexe TORC1 (mTOR/RAPTOR) impliqué lui dans la synthèse protéique et l'hypertrophie musculaire (Fig. 8; Latres et al., 2005).

L'activation de ces facteurs implique d'autres facteurs qui induisent des voies de signalisation antagonistes. La calcineurine qui est une protéine dont l'expression est dépendante des ions calcium lors de la contraction musculaire, est capable d'inhiber FoxO (Fig. 8). La leptine, dont le taux d'expression est dépendant de la prise alimentaire, est également impliquée dans l'inhibition de FoxO (Fig. 8). À l'inverse, certaines cytokines (TNF, *Tumor necrosis factor*) jouent un rôle effecteur de la dégradation protéique. C'est le cas de NF- κ B qui joue un rôle régulateur positif de MuRF-1 (Fig. 8 ; Braun and Gautel, 2011). Par ailleurs, IGF-1 (*Insuline-like Growth Factor 1*, facteur de croissance impliqué dans la régulation positive de la synthèse protéique et la différenciation musculaire) entraîne l'activation d'Akt et l'inhibition de FoxO *via* sa voie de signalisation impliquant la PI3K (Fig. 8). À l'inverse, la myostatine entraîne l'activation de FoxO *via* sa voie de signalisation des SMADs (Fig.8). La croissance des fibres

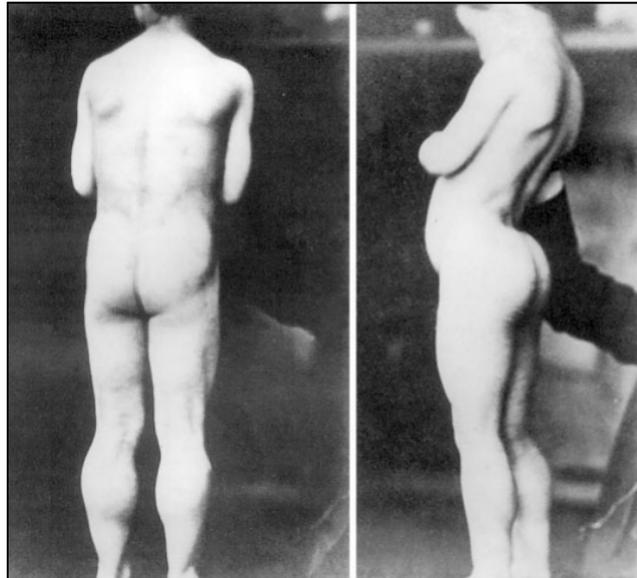


Figure 9 : Photo du premier patient de Guillaume Duchenne de Boulogne diagnostiqué pour la dystrophie musculaire de Duchenne.

On observe une cambrure anormale de la colonne vertébrale associé à une faiblesse des muscles inférieurs et une hypertrophie des mollets (Tyler, 2003).

musculaires est donc dépendante de cette balance entre l'expression de protéines impliquées dans la synthèse ou la dégradation protéique. La quantité de protéines synthétisées ou dégradées est elle-même dépendante des activités physiques (ex : modification du taux de calcineurine) et du régime alimentaire de l'individu (ex : modification du taux de leptine). L'action concertée de la myostatine et d'IGF-1 dans la croissance musculaire sera décrit plus en détail dans un chapitre à venir (cf. Introduction Bibliographique III. 3. c)).

b) Des phénotypes d'atrophie, de dystrophie et d'hypertrophie musculaire chez l'homme

Parfois des défauts du développement musculaire peuvent se produire et entraîner l'apparition de pathologies. Ces pathologies du muscle appelées myopathies peuvent avoir des causes diverses et ont de lourdes conséquences sur la vie de l'organisme. Parmi les myopathies, on distingue les atrophies musculaires (malnutrition, sarcopénie, cachexie), les dystrophies musculaires (dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, dystrophie musculaire des ceintures, dystrophie fascioscapulohumérale, etc.) et l'hypertrophie musculaire.

Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker

La dystrophie musculaire de Duchenne a été premièrement décrite en 1847 par le Dr Richard Partridge et doit en fait son nom au français Guillaume Duchenne de Boulogne qui, quinze ans plus tard, en fit une description quasi exhaustive. La dystrophie musculaire de Duchenne de Boulogne est une maladie génétique causée par une mutation du gène dystrophine (Kunkel et al., 1985; Monaco et al., 1986; Ray et al., 1985) qui aboutit à la synthèse d'une protéine tronquée. La dystrophine est une protéine qui établit un lien entre le cytosquelette d'actine et les protéines de la matrice extracellulaire, elle est impliquée dans le maintien de l'architecture des fibres musculaires (Michele and Campbell, 2003; Zubrzycka-Gaarn et al., 1988). Les patients qui présentent une dystrophine non fonctionnelle présentent des fibres musculaires qui s'altèrent (déchirement) lors des contractions musculaires. Ces cassures des fibres musculaires peuvent être mesurées par le taux de créatine kinase qui est plus élevée chez ces patients. Par ailleurs, le tissu musculaire abimé n'a qu'une très faible capacité de régénération. En effet, les cellules satellites des patients ont une capacité moindre de prolifération et s'épuisent rapidement (Blau et al., 1983; Heslop et al., 2000). Ainsi, le tissu musculaire abimé sera remplacé par du tissu fibreux et adipeux. Cette pathologie se traduit par une faiblesse musculaire des muscles inférieurs qui

s'étend vers les muscles du tronc associée à une hypertrophie des mollets (Fig. 9). Les patients ont de grosses difficultés à se lever et à se déplacer et requièrent un déplacement en fauteuil roulant dès l'âge de 10 ans. Des insuffisances cardiaques et pulmonaires associées à cette pathologie augmentent le taux de mortalité des patients qui décèdent alors entre 20 et 40 ans.

La dystrophie musculaire de Becker est également due à une mutation dans le gène de la dystrophine mais qui n'entraîne pas une perte de fonction totale de la protéine, le phénotype associé est atténué.

Les dystrophies musculaire des ceintures

Ces dystrophies englobent l'ensemble des maladies génétiques qui se traduisent par une dégénérescence progressive du muscle, principalement localisé au niveau de la ceinture pelvienne (muscles du bassin et des hanches) et de la ceinture scapulaire (muscles des épaules). Dans certains cas, les muscles respiratoires et cardiaques peuvent également être touchés. Elles sont classées selon leur mode de transmission génétique, autosomique dominant (de type 1) ou autosomique récessif (de type 2). À titre d'exemple, la dystrophie musculaire des ceintures de type 2G touche le gène de la téléthonine qui est nécessaire au maintien des myofibrilles (Moreira et al., 1997, 2000).

La dystrophie facioscapulohumérale

La dystrophie facioscapulohumérale est également une maladie musculaire d'origine génétique qui touche quant à elle les muscles du visage, des épaules et des bras et peut progresser jusqu'à toucher les muscles abdominaux et les membres inférieurs. Bien que cette pathologie soit transmise de façon autosomique dominante, les mécanismes moléculaires associés sont mal connus. Dans 95% des cas, l'apparition de cette pathologie est due à un raccourcissement de la région *D4Z4* du chromosome 4, constituée de séquences répétées, avec un nombre de séquences répétées inférieurs à 11. Ce raccourcissement influe sur l'expression de gènes et perturbe la différenciation cellulaire (Tawil et al., 2014).

La sarcopénie

Le terme « sarcopénie » provient du grec « *sarkos* = chair » et « *penia*=pauvreté ». Décrit dans les années 90, la sarcopénie n'est pas une pathologie. Il s'agit d'un syndrome qui apparait

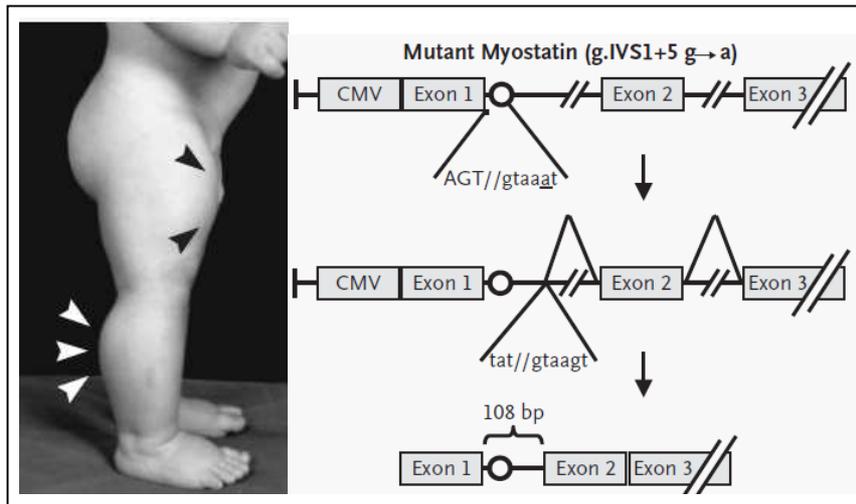


Figure 10 : Un cas d'hypertrophie musculaire chez l'homme.

Le petit garçon âgé de 7 mois sur la photo présente des protubérances musculaires (têtes de flèche) aux niveaux des cuisses et des mollets. Cette hypermusculature implique une mutation G→A dans l'intron 1 du gène *myostatine*. Cette mutation empêche la reconnaissance d'un site d'épissage et entraîne la production d'un transcrit plus long de 108pb. Ce transcrit contient un codon STOP prématuré qui est rapidement dégradé par les mécanismes de surveillances.

en général au cours du vieillissement et qui se caractérise par une perte involontaire, progressive et généralisée de la masse et de la force musculaire dépassant un certain seuil de normalité (Beudart et al., 2014). Ce syndrome se traduit par une fragilité physique et une diminution des performances physiques, une augmentation de la fatigue physique, une augmentation du nombre de chute et une perte de l'autonomie, et enfin une perte de la qualité de vie et une augmentation du taux de mortalité (Rizzoli et al., 2013). La sarcopénie a des causes diverses. Elle serait entre autres due à une vie sédentaire, à une baisse de la fonctionnalité des unités motrices au cours du vieillissement (Lexell, 1997), notamment celles contrôlant les fibres de types II qui sont moins sollicitées avec l'âge (Vandervoort, 2002) et à une diminution de la quantité de protéine nécessaire à la fonction musculaire, comme le facteur de croissance IGF-1 (Perrini et al., 2010). Ce syndrome serait atténué par des exercices physiques réguliers et un régime riche en protéine.

La cachexie

Le terme « cachexie » provient du grec « *kakos* » et « *hexis* » qui signifie « mauvaise condition ». La cachexie est un syndrome métabolique complexe. Encore une fois, il ne s'agit pas d'une pathologie en soi mais plutôt d'un symptôme qui apparaît associé à des pathologies. Le syndrome cachectique augmente le taux de morbidité et de mortalité du patient et se caractérise par une augmentation de la dégradation protéique et une perte de la masse musculaire avec ou sans perte de masse graisseuse (Evans et al., 2008). La cachexie est retrouvée associée à plusieurs pathologies comme le cancer, des maladies chroniques (broncho-pneumopathie chronique obstructive, insuffisance cardiaque, hépatique, rénale) ou des maladies infectieuses (SIDA). Ces pathologies entraînent la production de cytokines inflammatoires ; TNF- α , IFN- γ et des interleukines qui jouent un rôle dans la dégradation protéique (Glass and Roubenoff, 2010). La cachexie n'est pas due à une malnutrition et ne semble donc pas être réversible malgré un apport alimentaire conventionnel du fait du métabolisme anormal qui lui est associée.

Hypertrophie musculaire

Un cas d'hypertrophie musculaire a été décrit chez l'homme en 2004 (Schuelke et al., 2004). À la naissance, l'enfant de sexe masculin présentait des protubérances musculaires aux niveaux des cuisses et des avant-bras, des réflexes tendineux augmentés et des myoclonies (contractions involontaires du muscle) quelques heures après la naissance mais qui néanmoins disparaissent vers 2 mois (Fig. 10). À 4 ans et demi, ce petit garçon était capable de soulever des haltères de

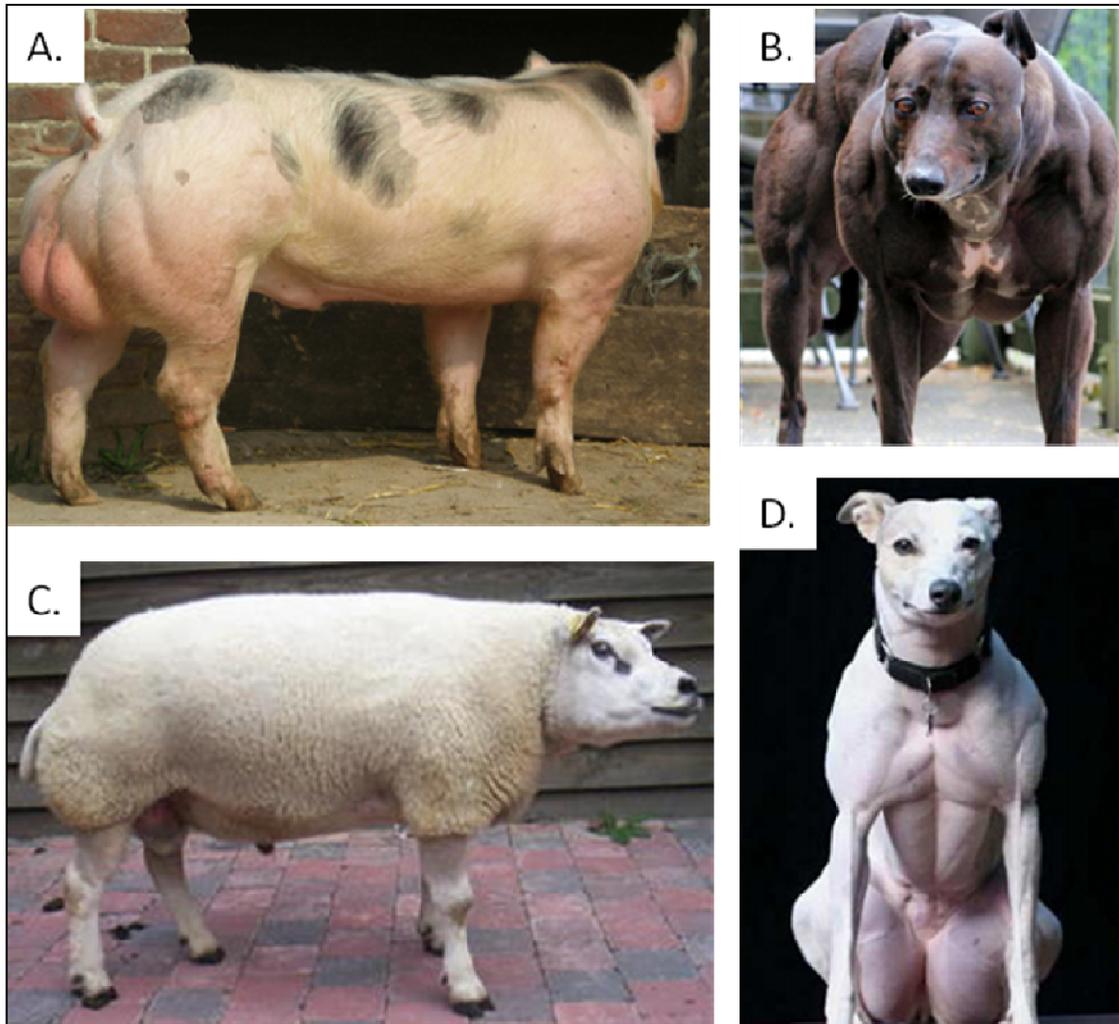


Figure 11 : Phénotype d'hypertrophie musculaire chez quelques espèces.

A, Porc de race Piétrain. B et D, lévriers Whippets. C, Mouton de race Texel.

3kg bras tendus à l'horizontal. Toutefois, il ne s'agit pas d'un cas sporadique puisque d'autres membres de sa famille du côté maternel présentent également une forte musculature à un moindre degré, comme sa mère qui est une athlète professionnelle sans problème de santé. La mutation causale de ce phénotype a été identifiée. Il s'agit d'une substitution G→A dans l'intron 1 du gène *myostatine*. Cette mutation empêche le mécanisme d'épissage de reconnaître le site 5' donneur légitime de l'exon 1 et entraîne la création d'un site d'épissage illégitime en aval de cette mutation dans l'intron 1, conduisant à l'insertion illégitime, au sein de l'ARNm, d'une partie de la séquence de l'intron 1 de 108-pb. Ce transcrit anormal prédit la production d'une protéine tronquée à cause de la présence d'un codon STOP prématuré. Cependant, aucun transcrit du gène *myostatine* ni sa protéine n'ont pu être détecté, ce qui suggère l'élimination de l'ARNm aberrant par le mécanisme de surveillance NMD (*Non sense-mediated Decay*). La mutation identifiée est donc une mutation perte de fonction totale de la protéine. L'enfant est homozygote mutant pour cette mutation tandis que la mère est hétérozygote. Le rôle de la myostatine dans le développement musculaire sera décrit plus en détail dans la 3^{ème} partie de cette introduction bibliographique.

Des phénotypes d'hypertrophie musculaire ont également été mis en évidence chez d'autres espèces. Il y a des phénotypes induits comme c'est le cas chez la souris (McPherron et al., 1997) qui permettent de comprendre les mécanismes moléculaires associés à l'apparition de ce phénotype et il y a aussi les phénotypes naturels d'hypertrophie musculaire. Les espèces possédant ces phénotypes naturels ont été sélectionnés pour des raisons économiques puisque certaines sont associées à une meilleure quantité et qualité de viande comme c'est le cas chez le porc, le mouton et la vache tandis que d'autres sont associés à de meilleures performances physiques comme c'est le cas chez le chien.

c) Phénotypes naturels d'hypertrophie musculaire chez d'autres espèces

Race porcine de Piétrain

La race porcine de Piétrain doit son nom à la région Piétrain où elle a été décrite pour la première fois en 1920 en Belgique. Les animaux de cette race présentent un phénotype d'hypertrophie musculaire (Fig. 11A) associé à un faible taux de masse grasse et à une sensibilité aigüe au stress, ce dernier aboutissant à un taux élevé de crises cardiaques. Ces animaux ont un bon rendement de carcasse avec la production d'une viande maigre très demandée par les

consommateurs. Cependant, la viande produite est dite exsudative (viande pâle et flasque inapte à certaines transformations comme le jambon), ce qui se traduit par une dénaturation marquée des protéines musculaires à cause d'une diminution de la capacité de rétention d'eau de la viande et d'une baisse de pH *post-mortem*. La sélection de ces animaux pour croisements peut se faire i) par une prise de la température de la croupe puisqu'une température élevée est associée à une diminution de la capacité de rétention d'eau et donc à une augmentation du caractère exsudatif de la viande, ou ii) par un test d'anesthésie à l'halothane qui entraîne chez ces animaux un syndrome d'hyperthermie maligne se traduisant par une augmentation de la température corporelle, syndrome aussi décrit chez l'homme (Ollivier et al., 1980). Les études ont montré l'implication d'une substitution d'un acide aminé arginine par une cystéine (R615C) dans le gène codant pour le récepteur ryanodine (*ryr1*), canal calcique du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique (Fujii et al., 1991). Cette mutation conduit potentiellement à une hypersensibilité du canal calcique au relargage du calcium et à une inhibition de la fermeture du canal, ce qui conduirait aux contractions musculaires, à un hypermétabolisme et à l'hyperthermie observés en présence du gaz halothane (Fujii et al., 1991; O'Brien, 1986). Cependant, cette mutation n'explique pas l'hypertrophie musculaire observée chez ces animaux, l'objectif étant à long terme d'éliminer l'allèle déficient de *ryr1* tout en conservant le phénotype d'hypermusculature. La similarité de ce phénotype hypermusclé avec le phénotype bovin a influencé les chercheurs à se focaliser sur le gène *myostatine*. Ils ont noté la présence fréquente en race Piétrain d'une mutation dans son promoteur au niveau d'un site de liaison à la protéine MEF3 (82% comparée à 20% chez d'autres races), avec une expression plus élevée des transcrits du gène *myostatine* dans le tissu musculaire des animaux homozygotes pour l'allèle muté. Cependant, l'implication de cette mutation dans l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire n'a pas été clairement démontrée (Stinckens et al., 2008).

Une race canine atypique : le lévrier Whippet

Le lévrier Whippet est une race canine spécialisée dans le sport de course. Un phénotype d'hypertrophie musculaire a été identifié chez cette race dont les animaux porteurs sont communément appelés « *bully* » Whippets pour leur forte musculature (Fig. 11B et D) ; une large poitrine, des pattes inhabituellement bien développées et une forte musculature des genoux (Mosher et al., 2007; Shelton and Engvall, 2007). Ces animaux ne présentent aucun problème de santé apparent mis à part des crampes aux épaules et aux cuisses. Là encore, le gène mis en

cause est le gène *myostatine*. En effet, une délétion de deux nucléotides dans l'exon 3 du gène *myostatine* a été identifiée. Elle conduit à un codon stop prématuré. La myostatine prédite se retrouve tronquée de 63 acides aminés par rapport à la protéine sauvage de 375 acides aminés. Les études ont montré que sur 146 animaux génotypés, 2 seulement sont homozygotes mutants et 20 sont hétérozygotes, ce qui note une faible fréquence de cette mutation dans la population. Néanmoins, cette faible fréquence peut être expliquée par le fort taux d'euthanasie chez ces animaux car non conformes aux critères de sélection. Enfin, les animaux hétérozygotes pour cette mutation ont de meilleurs résultats de course que les animaux sauvages. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la myostatine joue un rôle sur la proportion des fibres rapides de type II, glycolytiques (cf. Introduction bibliographique III.; Mosher et al., 2007).

Mouton Texel

Le mouton Texel, aussi appelé Beltex par les Belges est une race ovine qui provient de l'île Texel aux Pays-Bas. Elle se caractérise par un phénotype d'hypertrophie musculaire (Fig. 11C). La mutation mise en évidence chez le mouton Texel est une substitution G→A dans la séquence 3'UTR du gène *myostatine* (Clop et al., 2006). Le nucléotide A ainsi muté se positionne au sein d'un motif en octamère, site consensus de séquences cibles de miRNA (ACATTCCA) et devient un site cible illégitime des miRNA miR-1 et miR-206. L'action de ces miRNA entraîne l'inhibition de la traduction des transcrits du gène *myostatine* et contribue à l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire observé. Au niveau moléculaire, un certain taux de protéine a pu être observé à partir d'animaux homozygotes mutants. Ce taux représente 1/3 du taux de myostatine présent chez les homozygotes sauvages, mais ces études montrent que la mutation décrite n'entraîne pas une perte de fonction totale de la protéine (Clop et al., 2006; Takeda et al., 2010).

Mouton Callipyge

Le phénotype callipyge (du grec calli-, καλι « belles » et -pyge, πυγε « fesses ») a été décrit pour la première fois aux Etats-Unis dans les années 80. Ce phénotype d'hypertrophie musculaire (Fig. 12A) qui apparaît de façon post-natale seulement 3 à 4 semaines après l'agnelage est assez particulier. En effet, il n'implique pas le gène *myostatine* mais met en jeu un mécanisme complexe d'expression de gènes soumis à l'empreinte parentale (Fig. 12D). Le locus *callipyge* est localisé sur le chromosome 18, la mutation impliquée (*CLPG*) est une substitution

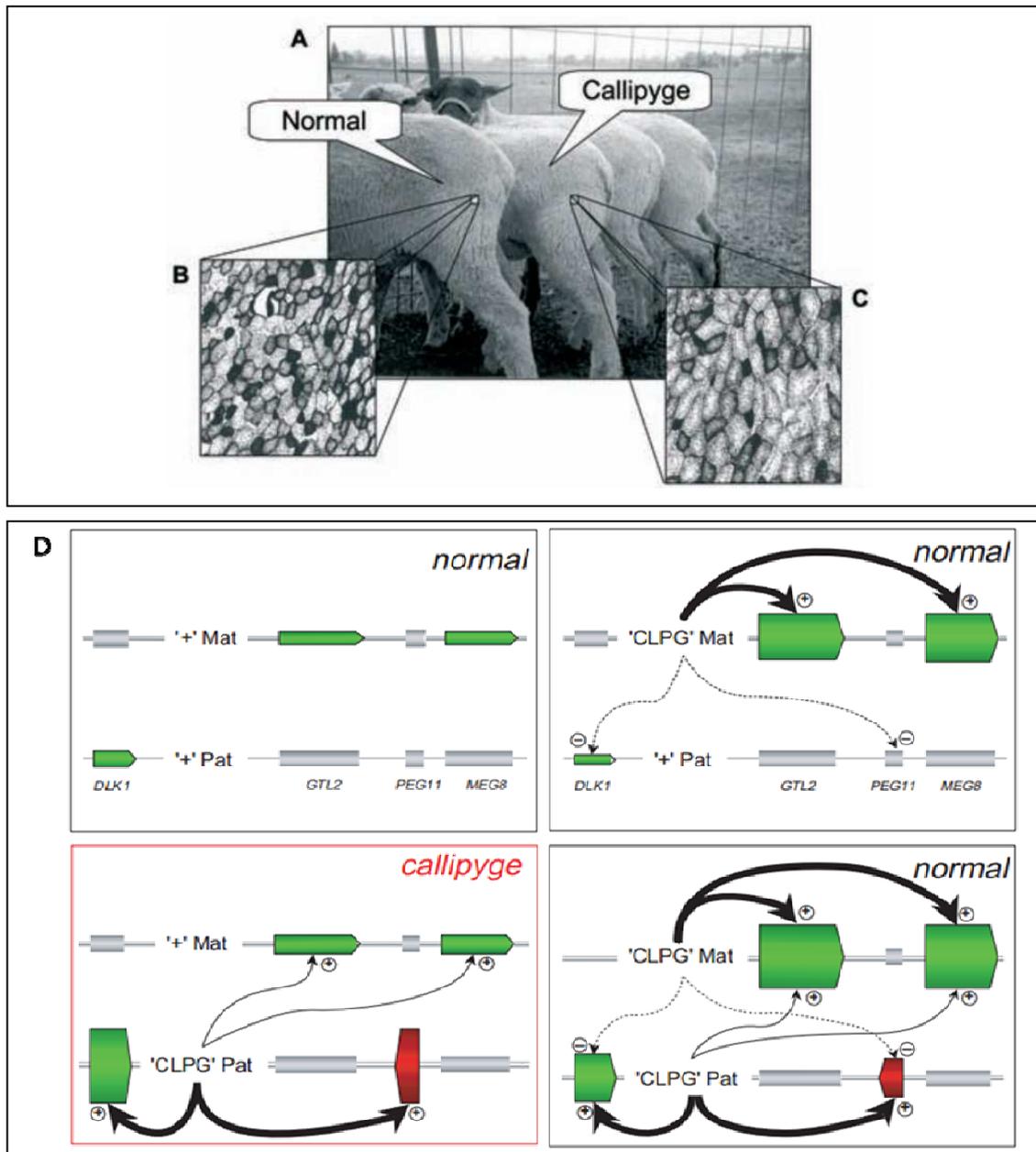


Figure 12 : Le phénotype callipyge.

A, Photo d'un mouton de phénotype normal (à gauche) et de phénotype hypermusclé (à droite). **B** et **C**, Coupe histologique d'un muscle à fibre rapide chez un animal normal (**B**) et hypermusclé (**C**). Le diamètre et la proportion des cellules sont plus élevés chez l'animal hypermusclé. **D**, Modèle moléculaire associé au phénotype callipyge, impliquant le phénomène d'empreinte parentale. Seuls les individus hétérozygotes avec l'allèle muté issu du père présentent le phénotype callipyge (Charlier et al., 2001). Mat : allèle maternel ; Pat : allèle paternel ; *Dlk1* : *Delta-Like 1 Homolog* ; *Gtl2* : *maternally expressed gene 3* ; *Peg11* : *Retrotransposon-like protein 1* ; *Meg8* : *maternally expressed gene 8* ; CLPG : callipyge.

A→G intergénique entre *Dlk1* et *Gtl2* (Freking et al., 2002; Smit et al., 2003) au sein d'un élément de contrôle de l'empreinte parentale (ICR) (Charlier et al., 2001). La puissance de cette mutation réside dans le fait que le phénotype callipyge ne se produit que lorsque cette mutation est à l'état hétérozygote et exclusivement portée par l'allèle d'origine paternel. C'est une transmission dite à surdominance polaire paternelle. Les scientifiques ont émis plusieurs hypothèses quant aux mécanismes moléculaires à l'origine de l'apparition de ce phénotype.

Néanmoins, le mécanisme modèle le plus approprié fait intervenir au moins quatre gènes soumis à l'empreinte parentale *Dlk1*, *Gtl2*, *Peg11* et *Meg8* au niveau de cet ICR. *Dlk1* code pour une protéine membre de la famille Delta-Notch. Elle est connue pour être un régulateur négatif de la différenciation adipocytaire largement exprimé au cours du développement. *Peg11*, aussi appelé *Rtl1*, code pour une protéine ayant une fonction essentielle dans la maintenance des capillaires sanguins à l'interface fœto-maternelle du placenta. *Gtl2* et *Meg8* sont des gènes produisant des ARN longs non codants pouvant avoir des effets inhibiteurs sur d'autres gènes. *Dlk1* et *Peg11* sont des gènes à empreinte maternelle c'est-à-dire qu'ils sont exprimés exclusivement à partir de l'allèle paternel (*p*) avec un effet régulateur positif. Au contraire, *Gtl2* et *Meg8* sont à empreinte paternelle, donc exclusivement exprimés à partir de l'allèle maternel (*m*) avec un effet régulateur négatif. Chez les individus *+m/+p* homozygotes sauvages, ces gènes ne sont pas (*Peg11*, *Gtl2* et *Meg8*) ou peu (*Dlk1*) exprimés en post-natal (Fig. 12D). Chez les individus *CLPGm/CLPGp* homozygotes mutants, l'expression de ces quatre gènes est activée par un effet en *cis* de la mutation sur les deux allèles, donc sur l'expression des quatre gènes (Fig. 12D). L'hypothèse est que l'effet positif des gènes *Dlk1* et *Peg11* est compensé par l'effet négatif des gènes *Gtl2* et *Meg8* qui agissent en *trans* sur *Dlk1* et *Peg11*, prévenant ainsi l'apparition du phénotype Callipyge. Chez les individus *CLPGm/+p* hétérozygotes mais porteurs d'un allèle muté d'origine maternel, *Gtl2* et *Meg8* sont fortement exprimés dû à l'effet de la mutation en *cis* mais sans conséquence sur le phénotype. Enfin, chez les individus *+m/CLPGp* hétérozygotes mais porteurs d'un allèle muté d'origine paternel, *Dlk1* et *Peg11* sont fortement exprimés à cause de l'effet en *cis* de l'allèle paternel muté. Ces effets n'étant pas compensés par une régulation négative en *trans* de *Gtl2* et *Meg8* (puisque la mutation n'a pas d'effet positif sur leur expression dans ce cas), alors la présence de la mutation sur l'allèle d'origine paternel aboutit à l'apparition du phénotype Callipyge. La mutation *CLPG* pourrait donc modifier l'activité d'un élément régulateur commun qui pourrait être un *enhancer* (boosté par la mutation)

***Georges Culley** (1734-1813) est un fermier célèbre de l'Angleterre du 18^{ème} siècle. Fils d'un père fermier, il implante avec deux de ses frères (Matthiew et James) leur propre corps de ferme à Fenton, une ville du comté de Northumberland dans l'extrême nord de l'Angleterre. Leur exploitation agricole est grandissante. Ils voyagent beaucoup à travers toute l'Angleterre et l'Ecosse où ils apprennent auprès des plus grands les différentes techniques agricoles employées en fonction de la qualité de la terre. Ils étaient toujours à la recherche de nouvelles idées novatrices pour l'amélioration de leur exploitation agricole. C'est ainsi qu'ils révolutionnèrent la culture agricole en abolissant le système de jachère pour le remplacer par un système de culture sur cinq ans d'avoines, de navets, de blés ou d'orges, ou enfin de pâtures pour les animaux. Ils virent ainsi leurs récoltes devenir plus abondantes et leur terre, qui s'appauvrissait peu à peu, retrouver sa fertilité originelle. Ils encouragèrent la culture de navets qui servait de nourriture aux bêtes pour l'hiver. Ils en améliorèrent la technique d'ensemencement et la vente de ces navets leur rapportait gros. Néanmoins, ils devinrent célèbres principalement pour leur création d'une nouvelle race ovine appelée « the Border Leicester », fruit de nombreux croisements entre la race Dishley à longue laine et la race Teeswater à phénotype large ainsi qu'avec d'autres races jusqu'à l'obtention d'animaux avec les caractéristiques souhaitées. Cette race s'appelle plus familièrement la race Culley.

****Suif :** Produit résiduel obtenu par la fonte de la graisse d'espèces animales comme le mouton et le bœuf. Cette matière première est utilisée en savonnerie pour la fabrication du savon par une réaction de saponification.

ou un *silencer* (inhibé par la mutation) (Bidwell et al., 2014; Charlier et al., 2001; Georges et al., 2003).

L'étude du muscle squelettique a donc deux intérêts majeurs. En recherche fondamentale, l'étude des mécanismes associés à l'apparition de myopathies sur modèles animaux permettrait la fabrication de traitement pour soigner les patients souffrant de pathologies musculaires. En sélection animale, l'étude des mécanismes à l'origine de l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire, qui a notamment été largement étudié en race bovine, permettrait la sélection d'animaux avec un meilleur rendement de viande et la production d'une viande de meilleure qualité. Ainsi, il est nécessaire de bien caractériser ce phénotype hypermusclé morphologiquement et génétiquement afin d'optimiser la sélection bovine.

4. Historique du phénotype hypermusclé bovin

Le développement des sciences animales et de l'environnement à partir du 19^{ème} siècle ainsi que les contrôles plus pointus des conditions d'élevage ont permis l'essor de projets d'études sur les espèces agricoles comme le bovin. Ainsi, en 1807, Georges Culley* décrit pour la première fois un phénotype bovin hypermusclé dans son livre intitulé « *Observations on livestock* » (Culley, 1807, 2002 ; Rowe, 1971).

L'objectif de ce livre était de décrire les caractéristiques de plusieurs races équine, porcines, ovines et bovines afin que les éleveurs puissent avoir une vue de l'ensemble des races présentes sur le territoire. Les éleveurs pouvaient alors ainsi choisir la meilleure race non pas à partir de critères de performances (phénotype extrême) mais plutôt à partir de critères d'adaptation de la race et de son rendement agricole selon sa localisation géographique.

Il décrit donc plusieurs races bovines qui présentent un phénotype musculaire plus large mais avec néanmoins des propriétés différentes. Ainsi, pour exemple, les races Longhorn et Shorthorn paraissent toutes deux hypermusclées. Néanmoins, la première a une excellente qualité de viande, un meilleur pelage et une peau plus fine, la seconde a un meilleur rendement de viande, de suif** et de lait.

Il y a donc en outre plusieurs races bovines qui présentent une musculature importante au sein de l'Angleterre – les races Teeswater, Longhorn et Shorthorn entre autres – mais cette

Tableau 1 : Différentes appellations du phénotype hypermusclé selon le critère pris en compte et la langue. (Modifié de Lauvergne et al., 1963)

Critères	Appellation	Langue d'appellation	Références
Aspect générale de l'hypertrophie musculaire	Double-muscled Dikbil	Anglais Belge/ Flamand	Weber et Ibsen (1934) Gotink (1955)
Aspect de l'hypertrophie musculaire par région	Doppellender (double rein) Groppa doppia (double croupe)	Allemand Italien	Kaiser (1988) Raimondi (1956-1957)
Développement exagéré de l'arrière-main	Culard Della coscia (Cuisse) Bottle thighed (Cuisse en bouteille)	Français Italien Anglais	Dénomination courante Raimondi (1956-1957) Weber et Ibsen (1934)
Développement exagéré de la croupe de cheval	Cul de poulain Groppa di cavallo	Français Italien	Thierry (1898) Brusaferro (1905)
Aire géographique où ont été observés les 1^{ers} animaux	Teeswater Yorkshire	Anglais Anglais	Shrode et Lush (1947) Shrode et Lush (1947)
Troubles de la fécondité associée au phénotype	Mulot Veau pif	Français Français	Dechambre (1910) Dechambre (1910)

diversité n'y est pas restreinte. En effet, selon Wriedt, un Allemand dénommé Kaiser aurait décrit ce phénotype bien avant le début du XXème siècle et l'aurait nommé « *Doppellender* » en allemand (Weber and Ibsen, 1935; Wriedt 1928). Un phénotype similaire est également décrit au Danemark par Möller et en Norvège par Pyndt. Le terme « *double-muscled* » provient quant à lui d'un éleveur Américain qui observa cet état de caractère apparaître chez un animal de son troupeau d'Hereford (Weber and Ibsen, 1935). D'abord appelé Yorkshire, ce terme restreignait l'apparition de ce caractère à une seule race. La présence de ce caractère chez cet animal Hereford entraîna la modification de leur appellation et ces animaux hypermusclés furent ensuite surnommé « *bottle thighed* » pour les cuisses en forme de bouteille et enfin « *double-muscled* » (Weber and Ibsen, 1935). En France, ces animaux sont communément qualifiés de « culards ». Les différentes appellations de ce phénotype selon la langue ont été données en se basant sur les critères récapitulés dans le tableau 1 (Lauvergne et al., 1963).

Les études se sont ensuite succédées dans le but d'établir un descriptif morphologique précis de ce phénotype et d'identifier l'origine génétique de l'apparition de ce phénotype d'hypertrophie musculaire.

5. Description du phénotype d'hypertrophie musculaire bovin

a) Caractéristiques morphologiques et bouchères

De manière générale, l'hypertrophie musculaire chez le bovin conduit à de meilleures valeurs bouchères, de 20% à 30% supérieures au minimum. Les animaux hypermusclés présentent un meilleur rendement de carcasse ainsi qu'un meilleur ratio masse maigre/ masse grasse. Alors que les muscles squelettiques sont plus larges en moyenne de 17%, les organes internes (foie, poumons, cœur, système digestif) sont réduits de 12-13% tandis que le tissu adipeux et la carcasse sont réduits de 44% et 14% respectivement. Cette diminution de la masse grasse et du dépôt de gras sous-cutané permet à la viande d'être plus tendre mais elle est en revanche moins persillée et a donc une moindre flaveur (Bailey et al., 1982). Néanmoins, la viande est plus pâle et a une teneur en eau plus élevée ce qui la rend meilleure (Ménissier, 1982a).

Par ailleurs, les animaux hypermusclés ont une teneur en collagène inférieure. Le collagène, qui participe au maintien du muscle au cours de la vie mais aussi de la viande au cours de la

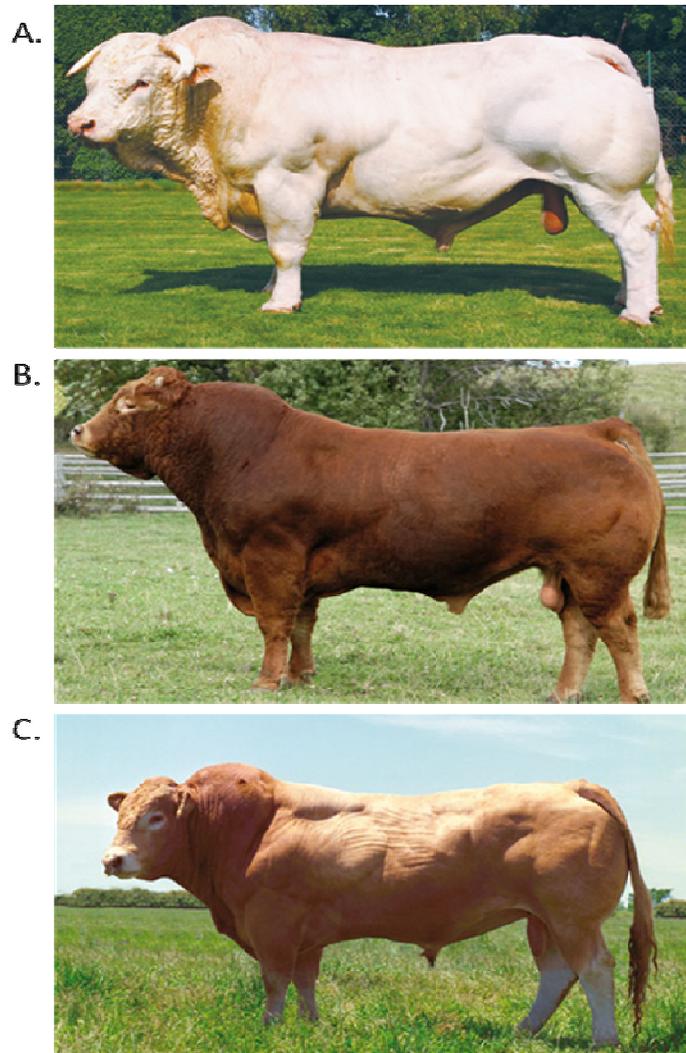


Figure 13 : Photos des 3 premières races bovines allaitantes Françaises.

A, Taureau de race Charolaise. **B,** Taureau de race Limousine. **C,** Taureau de race Blonde d'Aquitaine. L'hypermusculature est très prononcée au niveau du dessus des épaules et de l'arrière train. (Photos : <http://www.bovin.qc.ca> et <http://www.cia-crespelle.com>).

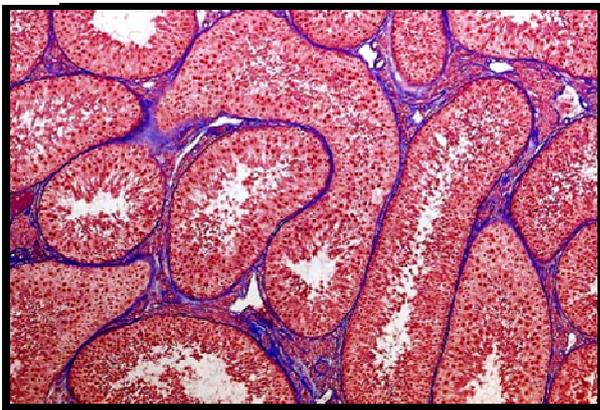
cuisson, détermine la texture de la viande. Il est moins épais au niveau des tissus connectifs comme le pérymysium, ce qui améliore la tendreté de la viande (Bailey et al., 1982).

De plus, les animaux hypermusclés ont un taux sanguin de créatinine élevé et un taux sanguin de créatine faible (Hanset and Michaux, 1982). La créatinine est le produit de dégradation de la créatine, et son dosage dans le sang ou dans les reins permet de donner des informations sur la fonction rénale et musculaire de l'individu. Ainsi, un taux faible de créatinine dénote potentiellement d'une atrophie musculaire tandis qu'un taux élevé de créatinine dénote potentiellement d'une hypertrophie musculaire. Les animaux hypermusclés présentent une plus forte proportion en fibres de type II (Gagnière et al., 1997) ainsi qu'une diminution du volume sanguin et du nombre de globule rouge. Au cours d'un exercice physique, la plus faible proportion de fibre oxydative de type I ainsi que l'apport plus lent de l'oxygène au muscle entraîne une diminution de la mobilisation du métabolisme oxydatif au profit du métabolisme glycolytique en anaérobic, les animaux hypermusclés présentent alors des signes plus rapides de fatigue physique. De plus, ils souffrent d'acidose métabolique suite à une mauvaise élimination de l'acide lactique (Ménissier, 1982a).

L'hypertrophie musculaire ne touche pas tous les muscles de la même façon. Elle est plus marquée au niveau des membres distaux (bras et jambes) qu'au niveau des muscles proximaux des régions pelviennes et scapulaires (Fig. 13). Bien que l'hypertrophie musculaire suive également un gradient antéropostérieur, elle est néanmoins nettement marquée aussi au niveau des épaules (Boccard et al., 1974). A l'inverse, l'ossature se réduit selon le même gradient antéropostérieur, ce qui rend le squelette de ces animaux très fragile. Les animaux hypermusclés souffrent également de problèmes respiratoires et cardiaques (Ménissier, 1982a).

De plus, les bovins hypermusclés éprouvent des difficultés d'adaptations aux conditions d'élevages. Ils sont notamment plus sensibles au stress et ont des difficultés à réguler leur température. En effet, lorsque la température augmente, leur large musculature entraîne une production de chaleur supérieure qu'ils ont du mal à dissiper par rapport aux animaux normaux. Ces difficultés sont accentuées par une surface d'échange du corps plus réduites car ce sont des animaux plus compacts, et des capacités respiratoires réduites car leurs organes internes comme les poumons sont de tailles réduites (Ménissier, 1982a).

A



B

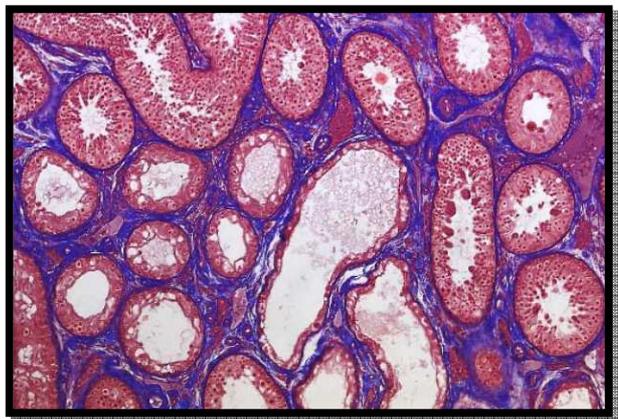


Figure 14 : Comparaison de coupes de testicule de taureaux Holstein-Friesian (A) et Blanc Bleu Belge (B).

A, Coupe de testicule d'un taureau Holstein-Friesian. Peu de dégénérescence des tubes séminifères (rouge). Peu de tissus conjonctifs interstitiels (bleu). **B**, Coupe de testicule d'un taureau Blanc Bleu Belge. Dégénérescence plus sévère des tubes séminifères (rouge) qui sont plus petits que chez le taureau Holstein-Friesian. Plus grandes quantité de tissus conjonctifs interstitiels (bleu) (Hoflack et al., 2008).

b) Reproduction des bovins hypermusclés

Chez le bovin, la reproduction est une condition *sine qua non* pour la production et la rentabilité économique. Une bonne fertilité du mâle et de la femelle est impérative pour une reproduction adéquate et performante.

Fertilité parentale

Fertilité du mâle

Malgré un rôle pilier du mâle géniteur en production bovine, aussi bien en production laitière qu'en production de viande, les études de fertilité se sont majoritairement focalisées sur l'analyse de la fertilité femelle. Une équipe de l'Université de Gent en Belgique a néanmoins réalisé une analyse comparative de la fertilité entre des mâles de la race allaitante Blanc Bleu Belge hypermusclée et des mâles de la race laitière Holstein-Friesan non hypermusclée. Cette étude était basée sur la sélection de taureaux en tant que meilleurs reproducteurs par l'examen de caractéristiques particulières telles que la morphologie de l'appareil génital mâle externe et interne (scrotum et testicule), la qualité du sperme (volume et constituant) ainsi que l'envie et le désir du taureau à la monte et l'accouplement. Ainsi, ils ont pu démontrer que les animaux de la race Blanc Bleu Belge n'étaient pas sélectionnés dans 93,7% des cas alors que les animaux de la race Holstein-Friesan n'étaient pas sélectionnés seulement dans 59,3% des cas. Dans leur analyse, ils ont pu noter que ces échecs de sélection étaient majoritairement dus à une moins bonne qualité du sperme (morphologie, vitesse et motilité des spermatozoïdes) et à une circonférence du scrotum qui est moindre. Les testicules présentent une forte dégénérescence des tubes séminifères et une augmentation de la quantité de tissus conjonctifs interstitiels (Fig. 14) ce qui pourraient expliquer la faible qualité du sperme chez les animaux de la race Blanc Bleu Belge hypermusclée (Hoflack et al., 2008). Quant à l'ardeur sexuelle mesurée par le temps de réaction et l'enthousiasme du taureau à la monte, ils n'ont pas noté de différence significative entre les animaux des deux races (Hoflack et al., 2006a, 2006b). Des travaux antérieurs avaient également permis d'observer une diminution du diamètre du pénis (de 2/3 par rapport à l'animal non hypermusclé) et du poids des testicules (60% du poids des testicules d'un animal non hypermusclé) ainsi qu'une diminution de la quantité et de la motilité des spermatozoïdes chez un animal hypermusclé croisé Africander-Aberdeen Angus (Kidwell et al., 1952).

Fertilité de la femelle

L'une des premières études visant à comparer la fertilité des femelles en utilisant deux groupes de vaches hypermusclées et non hypermusclées traitées dans les mêmes conditions dès la naissance a été réalisée dans les années 60-70 par l'équipe du Dr. Menissier (Vissac et al., 1973, 1974). Ils ont pu observer sur des génisses hypermusclées de race Charolaise un retard d'apparition de la puberté avec 50% des génisses hypermusclées non pubères à l'âge de 30 mois tandis que toutes les génisses non hypermusclées l'étaient. Néanmoins, après 5 ans, les femelles hypermusclées présentaient une fertilité comparable à celle des non hypermusclées. Ceci peut être lié au retard de croissance que subissent les femelles hypermusclées dont la courbe de croissance semble rattraper celle des femelles non hypermusclées aux alentours de 5 ans (Vissac et al., 1973). Après palpation rectale, ces génisses infantiles ne présentaient aucun follicule sur les ovaires. Après traitement hormonal, ils avaient pu observer la présence de follicule ovarien voir même de chaleur sur certaines génisses mais ces chaleurs étaient discrètes et brèves (Vissac et al., 1974).

Prédispositions morphologiques

Anatomie de l'appareil génital de femelle de race Asturienne

Au niveau de l'appareil génital femelle, il apparaît une hypoplasie de sa partie externe dû à l'absence de tissu adipeux sous-cutané qui pourrait être à l'origine d'une dysfonction des gonades. L'utérus présente des cornes plus courtes et plus grosses à cause d'une hypertrophie du myomètre. Le vagin et l'endomètre semblent normaux. La fonction ovarienne peut être altérée avec des croissances folliculaires qui aboutissent à l'atrophie sans ovulation et régression ultérieure des follicules atresiques. En revanche, les études montrent qu'avec un régime adapté aux bovins présentant ce phénotype d'hypertrophie musculaire, ces caractéristiques anatomiques sont normales (Quesada and Cachafeiro, 1972).

Incompatibilité morphologique fœto-maternelle

Les auteurs parlent d'une « incompatibilité » morphologique fœto-maternelle qui se traduit par une balance entre le poids inférieure de la mère et le poids supérieur du fœtus. En effet, du côté maternelle d'une part, ils ont pu observer une diminution de la taille et du poids des femelles hypermusclées en race Charolaise (Vissac et al., 1973) ainsi qu'une réduction de l'ouverture pelvienne en race Asturienne et Charolaise (Quesada and Cachafeiro, 1972; Vissac et al., 1973)



Figure 15 : Exemples de critères de sélection de femelles Limousine pour leurs aptitudes au vêlage.

A, Grosseur des canons. B, Largeur des trochanters C, Longueur du bassin. D, Inclinaison du bassin (Guide technique pointage Limousin 30 mois).

par rapport aux femelles normales. Cette mauvaise conformation au niveau du bassin serait due à l'hypertrophie des membres supérieurs de la cuisse qui modifierait la croissance du squelette au niveau du bassin : modification de la croissance coxal, diminution du diamètre sacro-pubien, rapprochement des ilions, écartement des trochanters (Quesada and Cachafeiro, 1972; Vissac et al., 1973). Ainsi, les éleveurs sélectionnent les femelles reproductrices en prenant en compte (en plus de la fertilité femelle) la conformation de celle-ci (Guide technique pointage Limousin 30 mois). Entres autres, les critères de sélections sont :

- la grosseur des canons** qui indiquent la finesse d'os de l'animal, le rendement carcasse et l'aptitude au vêlage (Fig. 15A).
- la largeur aux hanches, la largeur aux trochanters, la longueur du bassin, l'inclinaison du bassin, la largeur aux ischions** qui sont des indicateurs du volume du bassin et de l'aptitude au vêlage (Fig. 15B, C et D).
- **L'aplomb avant** qui correspond à la position des membres avant de l'omoplate au sabot et **l'aplomb arrière** qui correspond à la position des membres arrière du bassin au sabot et qui indiquent l'aptitude à la saillie et à la monte naturelle.

D'autre part, le fœtus subit une nette augmentation de son poids (au moins 5kg) si au moins l'un des deux parents est de phénotype hypermusclé (Vissac et al., 1973). De plus, le fœtus présente un développement en largeur avec une hypertrophie plus prononcé au niveau postérieur, +10% aux trochanters (Vissac et al., 1973). Les études sont quelques peu contradictoires quant aux liens entre l'augmentation du poids du fœtus et la durée de gestation. En effet, tandis que certains auteurs ne notent pas de différence nette de la durée de gestation en race Charolaise (Arthur et al., 1988; Vissac et al., 1973), d'autres observent une durée de gestation anormale car rallongée de 10 jours chez des femelles hypermusclées de race Asturienne (Quesada and Cachafeiro, 1972). Il est important de noter que ces résultats sont dépendants du type de croisement effectué (DMxDM, DMxN, NxN). Cette incompatibilité fœto-maternelle entraîne une expulsion plus délicate du fœtus et est donc l'une des causes majeures de l'augmentation des difficultés de vêlage chez les bovins hypermusclés.

Difficulté de vêlage et mortalité périnatale

Le vêlage nécessite une préparation naturelle de la femelle qui consiste en des modifications physiologiques. Selon si la femelle est primipare ou pluripare, il est observé un développement de la mamelle entre 1 mois et 1 semaine avant la parturition associé à un gonflement et à

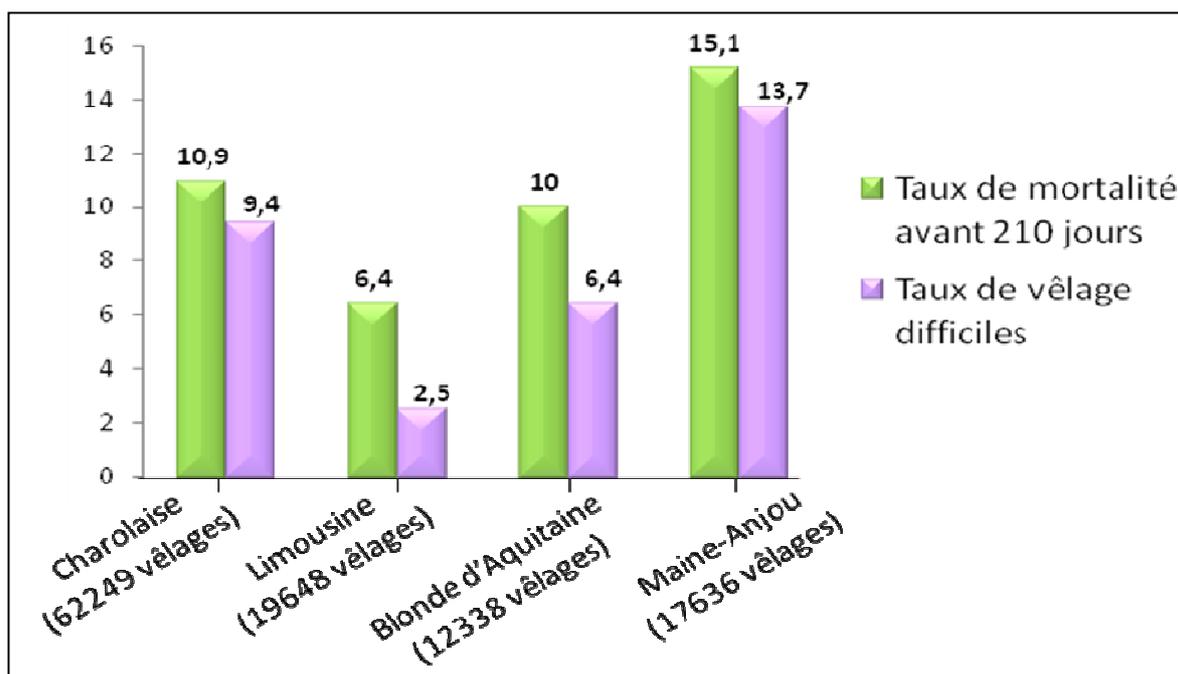


Figure 16 : % de mortalité périnatale et de vêlage difficile en race allaitante (à partir des données de Coutard et al., 2007).

l'apparition d'œdèmes. Un affaissement de la mamelle est ensuite observé 24h avant la mise-bas. Les ligaments sacro-sciatiques (au niveau de la fesse, à la base de la queue) se relâchent et le bassin modifie sa conformation pour l'expulsion du fœtus. La préparation à la mise-bas chez les femelles hypermusclées est mauvaise dans 34 à 36% des cas chez la Charolaise car elle est plus discrète. En effet, la mamelle ne se développe que tardivement, la conformation de la croupe masque le relâchement des ligaments et la cassure du bassin, la vulve est plus étroite et les lèvres vulvaires sont plus fermes et peu tuméfiées jusqu'à l'expulsion du fœtus. Ces caractéristiques ont pour conséquence une augmentation du nombre de césariennes (Arthur et al., 1988; Vissac et al., 1973, 1974)

Il est aussi observé un taux plus important de la mortalité périnatale qui est extrêmement dépendant de la race étudiée. En effet, une étude montre que chez la Salers, qui est une race intermédiaire ne présentant pas le phénotype d'hypertrophie musculaire, le taux de mortalité avant 240 jours est de 6.8% alors qu'il s'élève à 15.2% pour la Maine-Anjou, race présentant le phénotype d'hypertrophie musculaire (Offredo, 2010). La moitié de ce taux correspond à des veaux morts dans les 3 jours qui suivent la naissance. Une autre étude analysant le taux de mortalités des veaux avant 210 jours présente des données similaires (Fig. 16). En outre, elle montre que les vêlages sont plus fréquemment difficile chez la Maine-Anjou (13,7%) contrairement à la Limousine (2,5%) et à la Blonde d'Aquitaine (6,4%) (Fig. 16 ; Coutard et al., 2007).

Ce taux de mortalité périnatale est dû aux conditions de gestation et de vêlage, à la physiologie maternelle et fœtale et au comportement maternel après la parturition.

Chez les femelles normales, la parturition peut durer de 30min à 3h le temps que la partie femelle du placenta se détache de la partie fœtale. Cette particularité permet aux échanges circulatoires entre la mère et le veau de se poursuivre tardivement, jusqu'à l'expulsion du fœtus. En bovins hypermusclés, les vêlages sont plus rapides et spontanés ce qui peut en partie expliquer l'augmentation de la mortalité périnatale (Quesada and Cachafeiro, 1972). Les veaux souffrent de macroglossie (augmentation du diamètre de la langue) ce qui rend la succion des mamelles difficile. Quant aux mamelles, elles présentent une tétine plus élargie avec moins de colostrum (Arthur et al., 1988). La production de lait est inférieure au besoin du veau de 20% au 2^{ème} mois et de 30% au 3^{ème} mois (Vissac et al., 1974).

Les difficultés de vèlage entraînent un désintérêt des éleveurs pour ces races bovines hypermusclées dans leurs troupeaux malgré les avantages de production dont ils peuvent bénéficier.

Aujourd'hui des analyses d'associations génétiques sont réalisées afin de corréliser certains caractères avantageux avec d'autres dans le but d'intégrer des tests génétiques prenant en compte ces paramètres dans la sélection bovine (Cervantes et al., 2010). À la suite de ces tests génétiques, des croisements sont réalisés dans le but de créer une lignée améliorée pour sa conformation musculaire tout en limitant l'apparition des caractères désavantageux tels que les difficultés de reproduction.

Néanmoins, il a fallu quelques décennies pour déterminer l'origine génétique de l'apparition de ce phénotype hypermusclé.

6. Origine génétique du phénotype d'hypertrophie musculaire : découverte du locus *mh*

Au 19^{ème} siècle, alors que les lois sur la génétique sont peu connues, les éleveurs attribuaient l'apparition du phénotype hypermusclé à des facteurs environnementaux (processus de gestation, âge des reproducteurs et alimentation) qui influent sur le potentiel de croissance. À partir du début du 20^{ème} siècle, il a rapidement été admis que la transmission de ce caractère d'hypertrophie musculaire était héréditaire. En effet, les bovins hypermusclés n'apparaissent majoritairement pas de façon sporadique mais étaient surtout issus de croisement où au moins l'un des deux parents était hypermusclé. Les hypothèses furent nombreuses pour déterminer l'origine génétique de l'apparition de ce phénotype.

En 1928, Wriedt, (qui travaille sur la race Danish Shorthorn), suggère un rôle causal d'un seul facteur déterminant l'état de ce caractère musculaire héréditaire (Wriedt, 1928). Il ségrégerait de manière mendélienne et sa dominance serait variable de telle sorte que les hétérozygotes ne présenteraient pas obligatoirement une musculature excessive mais plutôt un phénotype intermédiaire voir conventionnel.

En 1935, Ibsen et Weber nuancent ce discours (Weber and Ibsen, 1935). Après leurs propres analyses de ségrégation par croisements dans un troupeau d'Hereford, ils concluent au contraire à l'existence d'une récessivité partielle de ce facteur.

Après l'observation d'un nombre important de races bovines différentes dans de très nombreux pays qui présentent ce phénotype hypermusclé, Wriedt propose l'idée que l'apparition de ce caractère n'est pas due à une unique mutation qui se serait produite une seule fois, ce qui appuie la pertinence et la légitimité de ces différentes hypothèses (Wriedt).

L'hypothèse de l'existence de plusieurs mutations indépendantes au fil du temps et aux quatre coins du monde persiste après la conclusion établie par les américains Ibsen et Weber après avoir effectué leurs propres analyses de ségrégations par croisements : ils ont comparé leurs résultats obtenus à partir de la descendance de l'animal Hereford hypermusclé de leur troupeau avec les résultats décrits par Wriedt et ont conclu qu'il n'y avait aucune corrélation ni du facteur ni du mode de transmission de ce facteur entre les animaux hypermusclés décrits par Wriedt et leurs animaux. Il est à noter que Ménissier, au contraire, suggère des années plus tard que le phénotype hypermusclé viendrait de la race Shorthorn qui aurait migré des îles britanniques vers le continent (Ménissier, 1982b).

En 1952, Kidwell appuie l'hypothèse de l'action d'un seul facteur à récessivité partielle (Kidwell et al., 1952) de par ses études sur la race Afrikaner-Angus.

Plus tard, une équipe espagnole décrira également ce phénotype hypermusclé au sein de la race Asturienne (Quesada and Cachafeiro, 1972). Par leur étude, ils suggèrent l'implication d'un seul gène A dont l'expression serait influencé par un second gène B, avec pour chacun un allèle fort (A ou B) et un allèle faible (a ou b). Le gène A entraînerait une prédisposition de l'animal pour l'apparition du phénotype hypermusclé, phénotype qui apparaîtrait uniquement en présence d'au moins un allèle B. Ainsi, ont été associés différents phénotypes du muscle avec leur génotype potentiel : « Culard » (AABB ou AaBB), « semi-culard » (AABb ou AaBb), « culardé » (aaBB ou aaBb), les normaux étant AAbb, Aabb ou aabb. Ces résultats expérimentaux confirment l'hypothèse selon laquelle l'origine génétique de l'apparition de ce phénotype dépend essentiellement de la race bovine étudiée. De plus, ils mettent en avant l'idée d'un gène majeur dont les effets seraient dépendants de l'expression d'autres gènes.

L'équipe belge de Hanset et Michaux (Charlier et al., 1995; Hanset and Michaux, 1985a, 1985b) étudièrent des croisements de bovins hypermusclés de race Blanc Bleu Belge de phénotype dit « viandeux » avec des bovins non hypermusclés de race Friesan de phénotype dit « conventionnel » (Fig. 17). Ils prédirent l'existence d'un locus d'hypertrophie musculaire qu'ils

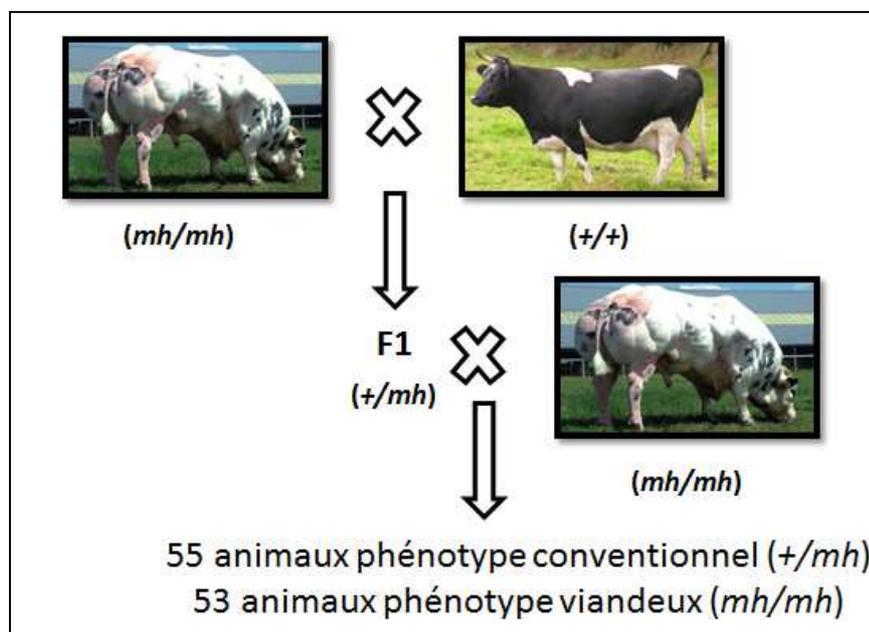


Figure 17 : Analyse de ségrégation de croisements expérimentaux dans la population Blanc Bleu Belge.

Le locus *mh* suit une ségrégation mendélienne. *mh* : *muscle hypertrophy*.

nommèrent le locus *mh* avec deux allèles en ségrégation ; l'un (+), l'allèle sauvage, et l'autre *mh*, l'allèle partiellement récessif. Ainsi les phénotypes de type « viandeux » seraient de génotype *mh/mh* et les phénotypes de types « conventionnel » seraient de génotype *+/+* ou *+/mh*.

Ils ont donc croisé un animal de phénotype « viandeux » et de génotype supposé *mh/mh*, avec un animal de phénotype « conventionnel » de génotype supposé *+/+*. La génération F1 était de phénotype « conventionnel » de génotype supposé *+/mh*. Les femelles F1 furent recroisées en *back-cross* avec un mâle de phénotype « viandeux » de génotype supposé *mh/mh*. La génération obtenue était composée de 50% d'animaux de phénotype « conventionnel » (*+/mh*) et 50% de phénotype viandeux (*mh/mh*) (Fig. 17). La ségrégation mendélienne de ce phénotype d'hypertrophie musculaire dans les croisements expérimentaux appuie l'hypothèse de l'existence d'un seul gène majeur autosomal récessif. De plus, par l'étude plus précise des paramètres de musculature des veaux issus des croisements, ils conclurent que et je cite « La présence d'une discontinuité dans la régression du pourcentage de veaux culards sur le degré de musculature des parents est incompatible avec un modèle polygénique à seuil [...], un seul gène majeur (symbole *mh*) est en jeu mais on montre qu'une variation génétique additionnelle [...] joue un rôle dans l'expression du caractère ». Par « variation génétique additionnelle », il faut comprendre que l'expression du gène en jeu serait sous l'influence épistatique de l'expression de gènes modificateurs ». La ségrégation mendélienne observée (Fig. 17) a conforté l'équipe Belge à cartographier le locus *mh*. Pour cela, ils ont utilisé des microsatellites répartis sur les 29 autosomes bovins de manière à couvrir uniformément le génome bovin (Charlier et al., 1995). Grâce à des analyses de liaison, ils ont pu localiser le locus *mh* au niveau du chromosome 2 bovin, à 2cM du marqueur TGLA44, ce qui prouve l'existence de ce gène majeur autosomal.

Alors que ces recherches se poursuivaient, un gène majeur du développement musculaire a été identifié, c'est le gène *GDF8* pour *Growth Differentiation Factor 8*, ou plus communément appelé le gène *myostatine* (McPherron et al., 1997).

II. La *myostatine* : gène majeur du développement musculaire

1. Découverte du gène *myostatine*

Le gène *GDF8/myostatine* a été découvert en 1997 par l'équipe du Dr. Lee dans le laboratoire de génétique et biologie moléculaire de l'Université de médecine Johns Hopkins dans le Maryland aux Etats-Unis (McPherron et al., 1997).

C'est un projet de recherche ayant pour objectif l'identification de protéines essentielles au bon développement embryonnaire des mammifères, en particulier celles appartenant à la superfamille des TGF- β , qui est à l'origine de cette découverte.

a) La superfamille des TGF- β

En 1978, une équipe menée par le Dr. Todaro de l'Institut National contre le cancer dans le Maryland identifie de nouveaux polypeptides assimilés à des facteurs de croissance grâce à un modèle de fibroblastes de souris transformés par le sarcoma-virus (de Larco and Todaro, 1978). Ces *Transforming Growth Factors* nouvellement nommés ont les propriétés dans une cellule induite de pouvoir la modifier morphologiquement et d'accélérer sa croissance. De plus, ils ont montré que ces polypeptides pouvaient agir à la fois par le récepteur à l'EGF déjà connu alors, mais pas uniquement. Croyant dans un premier temps que ces polypeptides ne pouvaient être produits que par les cellules transformées par le sarcoma-virus, ils ont ensuite pu démontrer l'existence biologique de ces polypeptides dans des tissus sains (Roberts et al., 1980, 1981).

Par la suite, ces *Transforming Growth Factors* ont été divisés en deux superfamilles : les TGF- α et les TGF- β (Roberts et al., 1983). Les membres de la première catégorie ont leurs voies de signalisation qui passent obligatoirement par un récepteur à l'EGF tandis que ça n'est pas le cas pour les membres de la deuxième catégorie même si la présence de l'EGF ou d'un EGF-like semble nécessaire à leur bon fonctionnement.

Aujourd'hui, les *Transforming growth factors- β* sont définis comme étant des cytokines morphogènes gouvernant un vaste panel de processus de développement chez l'embryon ainsi

que l'homéostasie et la régénération tissulaire chez l'adulte. Ces protéines jouent un rôle dans la croissance, la prolifération, la migration, la différenciation et la survie cellulaire mais aussi dans la formation de la matrice extracellulaire. À une autre échelle, elles ont un rôle dans l'adipogenèse, la chondrogenèse, la myogenèse, l'hématopoïèse et la différenciation des cellules épithéliales. Des défauts de leurs activités peuvent entraîner des pathologies telles que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, musculo-squelettiques et fibreuses (pour revue Horbelt et al., 2012).

Le 1^{er} membre de la superfamille des TGF- β à avoir été identifié est TGF- β -1 extrait à partir de plaquettes humaines (Assoian et al., 1983). Depuis, pléthore d'études ont permis l'identification de plus d'une trentaine de membres de cette superfamille qui se divise elle-même en plusieurs sous familles selon les propriétés structurales de ses membres, les voies de signalisation impliquées et leurs fonctions tissulaires. Trois sous familles ont ainsi pu être distinguées : les TGF- β , les activine/inhibine et les DVR (*Decapentaplegic-Vg-Related*) comprenant les BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) et les GDF (*Growth Differentiation Factor*).

b) Identification du gène *myostatine*

Les travaux réalisés en 1997 chez la souris dans le laboratoire du Dr. Lee consistent en l'utilisation d'oligonucléotides dont les séquences ont été savamment dessinées pour correspondre à des régions géniques conservées chez tous les membres de la superfamille des TGF- β tout en étant dégénérées à certains endroits. Ces oligonucléotides sont ensuite utilisés comme amorces en PCR afin d'obtenir un pool de séquences amplifiées soit à partir de gènes déjà connus soit à partir de nouveaux gènes. Les séquences amplifiées à partir de gènes déjà connus sont ensuite éliminées par l'hybridation de sonde leur correspondant ce qui permet de conserver uniquement les séquences ne correspondant à aucun gène connu. Ces séquences d'ADN sont ensuite elles-mêmes hybridées à une banque d'ADNc produite à partir d'ARNm extrait de moelle osseuse et d'ovaire. L'utilisation des ADNc comme sonde d'hybridation permet d'isoler, d'identifier et de caractériser les gènes correspondants mais également d'obtenir le transcrit dans sa totalité (Okayama and Berg, 1982). Cette technique a ainsi conduit à l'identification entre autres de *GDF3* et *GDF9* (McPherron and Lee, 1993), *GDF5*, *GDF6* et

GDF7 (Storm et al., 1994), *GDF10* (Cunningham et al., 1995), et *GDF11* et *GDF8/myostatine* (McPherron et al., 1997).

Cette étude et celles qui ont suivies ont permis d'en connaître un peu plus sur le gène *myostatine*, d'en établir son profil d'expression, sa structure et sa fonction biologique.

c) Profil d'expression

Les premières expériences de détection du profil d'expression des transcrits du gène *myostatine* ont été réalisées également par l'équipe du Dr. Lee chez la souris par hybridation *in situ* (McPherron et al., 1997). Les transcrits du gène *myostatine* sont détectés à des stades très précoces au niveau des somites en développement dès le jour 9.5pc pour les somites les plus matures puis l'expression des transcrits du gène *myostatine* s'étend à tous les somites et enfin dans l'ensemble du compartiment myotomique au cours du développement. À l'âge adulte, les transcrits du gène *myostatine* voit leur expression quasiment restreinte au niveau du muscle (Kambadur et al., 1997; McPherron et al., 1997). Ce profil d'expression suggère un rôle de la myostatine dans le contrôle de la croissance des fibres musculaires au cours du développement musculaire embryonnaire, fœtal et post-natal.

De plus, des transcrits du gène *myostatine* bovin, ovin et murin ont été détectés dans du tissu cardiaque fœtal et adulte, ce qui suggère que la myostatine aurait un rôle cardiaque dès les stades précoces du développement (Sharma et al., 1999). Son expression dans le cœur laisse penser qu'elle aurait un rôle dans la prolifération et la différenciation des cardiomyocytes en contrôlant la progression du cycle cellulaire (Sharma et al., 1999). Son expression dans des tissus pathologiques comme le cœur après un infarctus fait penser que la myostatine tiens un rôle dans le cas de conditions physiopathologiques.

Une autre équipe a pu observer son expression au niveau de la glande mammaire en lactation chez le porc, indiquant un rôle potentiel de la myostatine au cours du développement mammaire ou au cours de la lactation (Ji et al., 1998).

Enfin, des transcrits du gène *myostatine* ont également pu être identifiés dans les cellules mitrales des neurones du bulbe olfactif et du cortex olfactif (Iwasaki et al., 2013; Jeanplong et al., 2013), dans de l'épiderme et du derme (Zhang et al., 2012a) et dans du tissu adipeux (McPherron et al., 1997).

Espèce	Transcrits de la myostatine	Ta lle Séquence codante	Taille protéine
Homme		1128nt	375aa
Souris		1131nt	376aa
Vache (a)		1128nt	375aa
Vache (b)		966nt	322aa
Poulet (a)		1128nt	375aa
Poulet (b)		384nt	128aa
Canard (a)		1128nt	375aa
Canard (b)		375nt	124aa
Canard (c)		375nt	124aa
Canard (d)		831nt	276aa
Truite Arc-en-ciel (1a)		1119nt	373aa
Truite Arc-en-ciel (1b)		1119nt	373aa
Truite Arc-en-ciel (2a)		1092nt	363aa
Truite Arc-en-ciel (2b)		1045nt	348aa

Figure 18 : Transcrits canoniques et transcrits alternatifs du gène *myostatine* chez différentes espèces.

Avant de décrire plus en détail les rôles biologiques de la myostatine dans le muscle et à moindre niveau dans le tissu adipeux, je vais faire un point sur la structure de la myostatine (structure du gène et de la protéine), son expression, sa régulation à différents niveaux (transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel) et sur ses voies de signalisation.

2. Structure et transcrits du gène *myostatine*

a) Structure du gène et homologies entres espèces

Chez l'homme et le bovin, le gène *myostatine* est localisé sur le chromosome 2 (2q32.2 et 2q14-15 respectivement) tandis qu'il est sur le chromosome 1 chez la souris (1 C1.1 ;1 26.99 cM). Il est constitué de 3 exons codants et 2 introns. Les séquences codantes humaines et bovines présentent 91,1% et 89,1% d'homologie avec la séquence murine respectivement (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997). Les 3 exons codent pour une protéine de 375 acides aminés chez l'homme et le bovin et 376 acides aminés chez la souris. La partie bioactive de la protéine est codée par l'exon 3 quelque soit l'espèce étudiée. La séquence protéique bovine prédite présente 92,5% d'identité avec la séquence murine (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997).

Chez l'homme, l'intron 1 est de 1789-pb et l'intron 2 est de 2424-pb (Fig. 18). Trois sites d'initiations de la transcription à -76, -116 et -166 ont été mis en évidence (Gonzalez-Cadavid et al., 1998).

Chez la souris, l'intron 1 est de 1742-pb et l'intron 2 est de 1995-pb (Fig. 18). Le site d'initiation de la transcription connu est localisé 103 nucléotides en amont du codon d'initiation de la transcription.

Chez le bovin, l'intron 1 est de 1831-pb et l'intron 2 de 2033-pb (Fig. 18). La région 5'UTR connue est de 133-pb en amont du codon d'initiation de la traduction et au moins 3 sites de polyadénylation ont pu être mis en évidence dans la région 3'UTR qui peut donc être de longueur variable ; 1320-pb, 1431-pb et 1506-pb (Jeanplong et al., 2001).

Le gène *myostatine* est retrouvé dans d'autres espèces de mammifères mais aussi chez les oiseaux et les poissons. Entres autres, il est aussi retrouvé chez le rat, le babouin, le porc, le

bovin, l'ovin, le cheval, le mouton, le poulet, la dinde et le poisson zèbre avec toutes les caractéristiques du gène *myostatine* murin. La séquence qui constituera la partie active de la myostatine est homologue à 100% entre la souris, le rat, l'homme, le porc, le poulet et la dinde tandis que chez le bovin, l'ovin et le babouin elle ne diffère que de 1 à 3 acides aminés. Chez le poisson zèbre en revanche, cette partie de la myostatine n'est homologue que de 88% par rapport à la séquence murine (McPherron and Lee, 1997).

Chez le poisson, bien que des différences existent entre les différentes espèces, les transcrits du gène *myostatine* sont détectés dans plus de tissus que chez les mammifères : le muscle squelettique, le cerveau, les yeux, le système digestif, les filaments branchiaux, les gonades, les reins (Rodgers et al., 2001). Cette détection suggère une action de la myostatine dans le contrôle homéotique de ces tissus selon les espèces de poissons et pas une action qui se limiterait au contrôle de la croissance musculaire. La myostatine pourrait donc avoir un rôle dans la myogenèse, dans l'osmorégulation (expression branchiale), dans le maintien des tissus reproductifs (expressions dans les ovaires et dans les testicules) dans la croissance et le développement neuronal (expression dans le cerveau) qui, chez le poisson contrairement aux mammifères, continue tout au long de la vie (Rodgers et al., 2001).

Chez le tilapia *Oreochromis mossambicus* et le bar blanc *Morone chrysops* par exemple, ont été identifiés des isoformes du gène *myostatine* avec des séquences codantes de 1128-pb (pour une protéine de 376 acides aminés) et de 1131-pb (pour une protéine de 377 acides aminés) respectivement (Rodgers et al., 2001). Ces séquences sont homologues à 62% et 73% respectivement par rapport à la myostatine de mammifère au niveau de la séquence protéique totale, et homologues à 91% et 95% si on n'analyse que la partie bioactive (Rodgers et al., 2001). Chez ces espèces de poisson, l'expression du gène *myostatine* a pu être détectée dans le muscle squelettique, les yeux, les filaments branchiaux, les ovaires, le système digestif et le cerveau mais pas dans le foie, les reins, l'estomac ou le cœur (Rodgers et al., 2001).

Une duplication ancestrale (350 000 000 ans) s'est produite entraînant la production de deux isoformes MSTN1 et MSTN2 chez certains poissons téléostéens (Amores et al., 1998; Kerr et al., 2005; Postlethwait et al., 1998) comme c'est le cas pour la dorade royale *Sparus aurata* (Maccatrozzo et al., 2001). La trétraploïdisation des salmonidés (25 000 000-100 000 000 ans) a conduit à une nouvelle duplication qui a entraînée la production de quatre isoformes du gène *myostatine* (Phillips and Ráb, 2001) comme chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*

(Garikipati et al., 2006, 2007; Roberts and Goetz, 2001) et le saumon *Salmo salar* (Ostbye et al., 2007; Østbye et al., 2001) : MSTN1a, MSTN1b, MSTN2a, MSTN2b (Fig. 18).

Chez les invertébrés, le gène *myostatine* a pu être identifié chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Lo and Frasch, 1999) la coquille Saint-Jacques *Argopecten irradians* (Kim et al., 2004) et chez deux membres de la familles des chordés *Ciona intestinalis* et *Branchiostoma belcheri tsingtauense* (Xing et al., 2007). L'identification du gène *myostatine* dans ces espèces a permis de dater l'apparition du gène *myostatine* à 900 000 000 d'années avant la divergence entre amphibiens et mammifères (Xing et al., 2007).

b) Différents transcrits par épissage alternatif

Ainsi, bien que des différences soient observées entre les espèces, le gène *myostatine* produit un transcrit canonique de structure très similaire chez la plupart des espèces étudiées, surtout au niveau de la partie exonique codant pour la partie bioactive de la protéine. Néanmoins, des isoformes de ces transcrits par épissage alternatif ont été identifiés chez certaines espèces (Fig. 18). C'est notamment le cas chez le crabe *Gecarcinus lateralis*, la truite *Oncorhynchus mykiss*, le poulet, le canard, le mouton, le dauphin, le porc et la vache (Castelhano-Barbosa et al., 2005; Covi et al., 2008; Garikipati et al., 2007; Jeanplong et al., 2013). Chez le crabe *Gecarcinus lateralis*, la myostatine produite est de 497 acides aminés. Un transcrit alternatif a été identifié. Il présente une délétion de 24 nucléotides qui entraîne l'apparition d'un codon STOP prématuré et la production d'une protéine tronquée de sa partie bioactive (Covi et al., 2008). Par ailleurs, les quatre isoformes transcriptionnelles du gène *myostatine* sont retrouvés chez la truite arc-en-ciel : MSTN1a MSTN1b, MSTN2a et MSTN2b (Fig. 18). Par la présence de deux codons STOP prématurés dans l'exon 1 de MSTN2b, les auteurs ont suggéré que MSTN2b est un pseudogène (Garikipati et al., 2007). De plus, un transcrit alternatif du gène *myostatine* a pour la première fois été découvert récemment chez les mammifères. Ce transcrit, appelé MSV, a d'abord été identifié chez le mouton, et a été aussi retrouvé chez le porc, le dauphin et la vache (Fig. 18, vache b ; Jeanplong et al., 2013). Ces transcrits alternatifs qui produisent une protéine tronquée de sa partie bioactive semblent avoir un rôle physiologique puisqu'ils permettraient une régulation négative de la myostatine.

Nous verrons par la suite que les séquences codantes et non codantes (promoteur, séquences introniques et séquences non codantes régulatrices) du gène *myostatine* sont la cible d'une

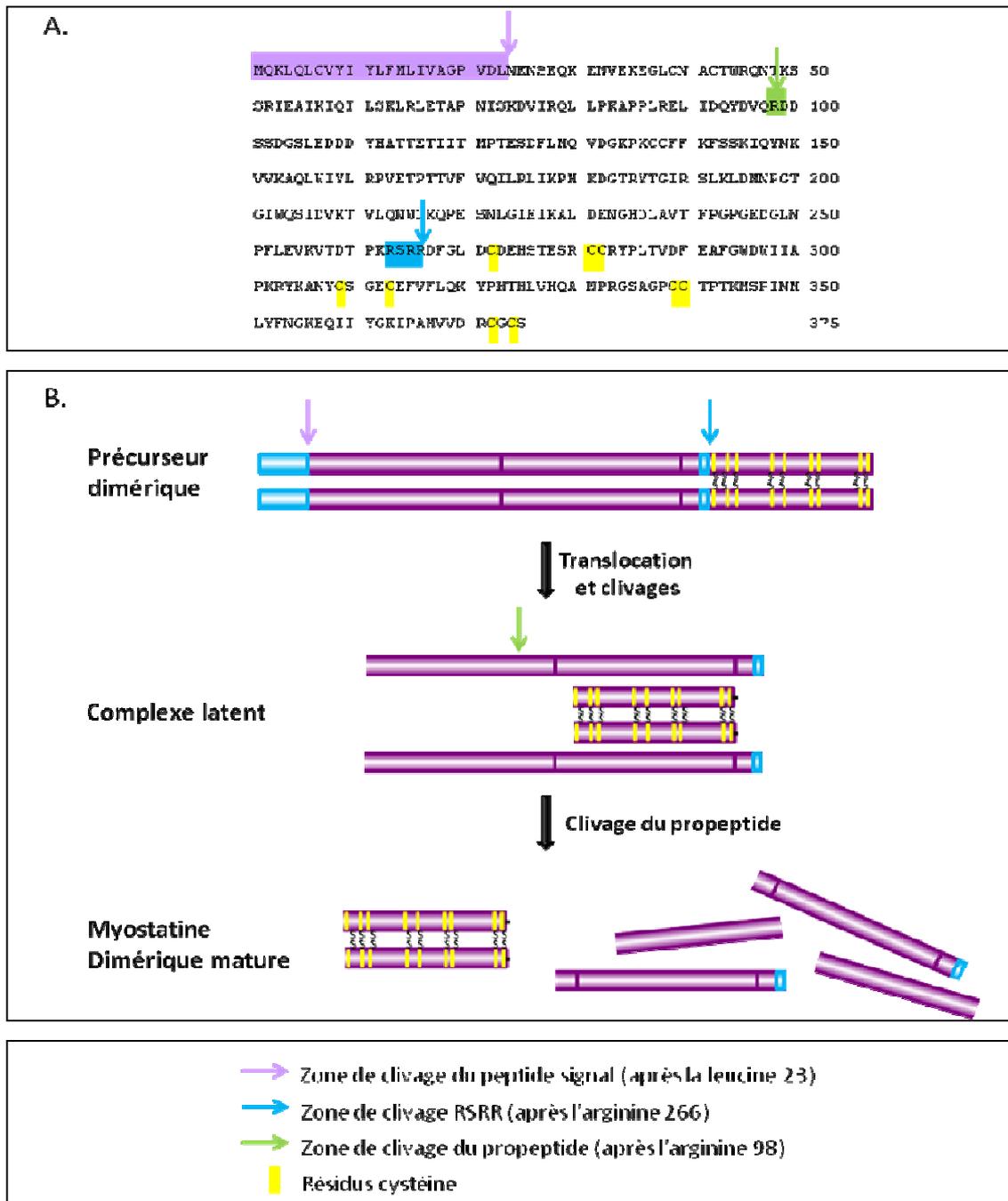


Figure 19 : Séquence peptidique et maturation de la myostatine.

A, Séquence peptidique de la myostatine. **B**, Maturation de la myostatine. La forme précurseur de la myostatine se dimérise immédiatement et subit une succession de clivages : clivage du peptide signal et de la partie C-terminale. La partie C-terminale dimérique reste liée de façon non covalente à la partie N-terminale. Un troisième clivage dans le propeptide permet la libération de la myostatine dimérique mature et bioactive.

régulation fine et que des mutations dans ces séquences peuvent aboutir à la production de transcrits et/ou de protéines anormaux avec des conséquences phénotypiques sévères.

3. Structure et régulation de la myostatine

Grâce à l'obtention du transcrit entier du gène *myostatine*, sa séquence protéique entière a pu être prédite. Elle possède toutes les caractéristiques d'un membre de la superfamille des TGF- β incluant (Fig. 19 ; McPherron et al., 1997) :

- un peptide signal contenant des acides aminés hydrophobes pour la sécrétion
- un site de clivage protéolytique
- une région C-terminale riche en résidus cystéine permettant la formation de ponts disulfures intra et intermoléculaire participant ainsi au repliement de la protéine et à sa dimérisation.

a) Maturation

La myostatine est dans un premier temps synthétisée sous une forme précurseur (Fig.19B) qui va immédiatement se dimériser au niveau des acides aminés cystéine en formant des ponts disulfures (Taylor et al., 2001). Ensuite, la myostatine va subir deux premiers clivages (Fig. 19B). Le premier, dans sa partie N-terminale va permettre de retirer le peptide signal constitué des 23 premiers acides aminés (Fig. 19A et B), une fois que la protéine eu été adressée et transloquée dans le réticulum endoplasmique. Le second clivage se produit au niveau du site protéolytique de clivage RSRR (acides aminés 264-267 chez la souris et 263-266 chez l'homme et le bovin) consensus des autres protéines membres de la famille des TGF- β (Figure 19A et B). Ce second clivage protéolytique est réalisé par la furine, aussi appelée PACE (*paired basic amino acid cleaving enzyme*), membre de la famille des *subtilisin-like proprotein convertase* (Lee and McPherron, 2001; Wise et al., 1990), au niveau de l'appareil de Golgi (Thomas, 2002). La myostatine est donc une protéine qui est sécrétée, elle est circulante dans le sang (Gonzalez-Cadavid et al., 1998). La partie C-terminale dimérique reste associée de façon non covalente au propeptide sous la forme d'un complexe latent (LAP). C'est un troisième clivage au niveau du propeptide qui va permettre la libération de la partie C-terminale dimérique de la myostatine (Fig. 19A et B), partie mature et bioactive (~25kDa). Ce clivage se produit entre les acides

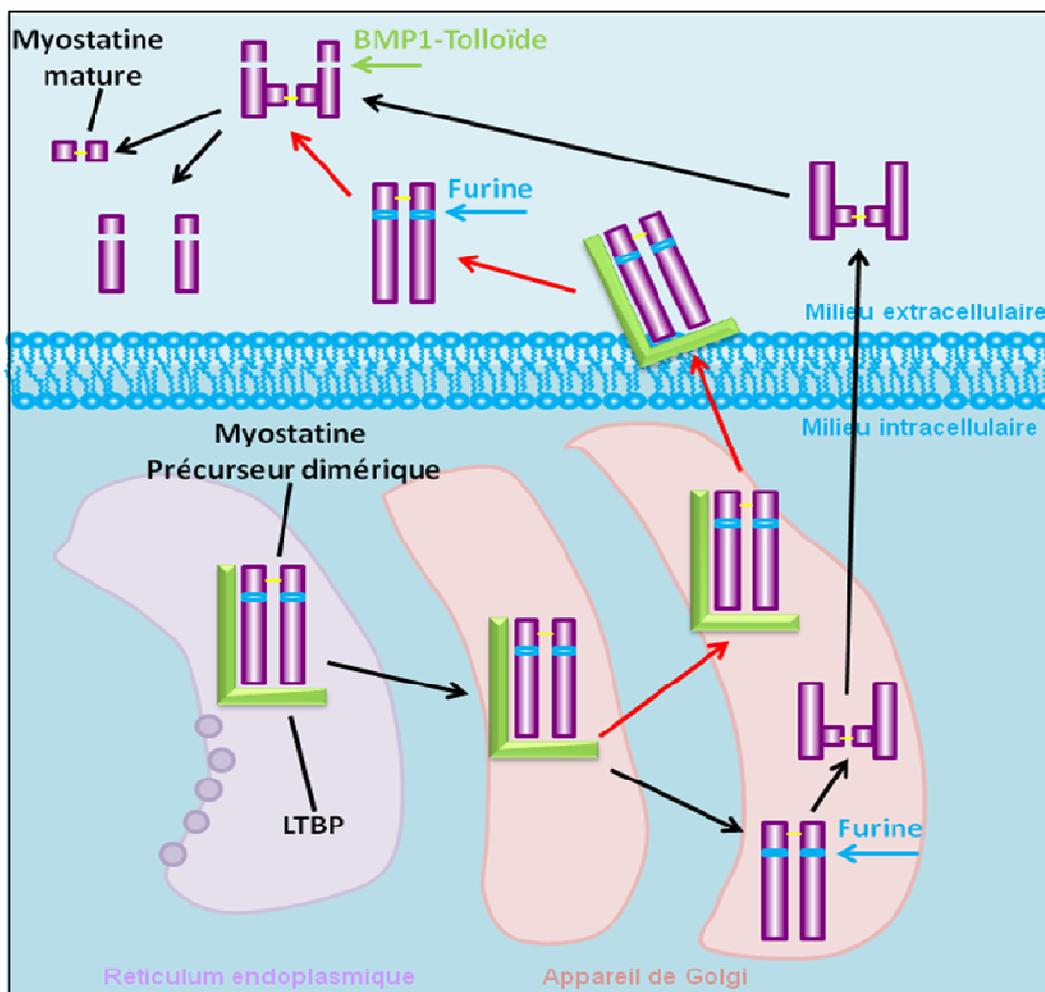


Figure 20 : Modèles de la maturation et de la sécrétion de la myostatine.

Les flèches noires indiquent le modèle connu. Le précurseur dimérique de la myostatine associé à LTBP dans le réticulum endoplasmique en est libéré dans l'appareil de Golgi par le clivage effectué par la furine au niveau de la séquence RSRR. La partie C-terminale dimérique forme un complexe latent qui est sécrété dans le milieu extracellulaire. La myostatine mature et bioactive est libérée par un clivage dans le propeptide par BMP1-Tolloïde. Les flèches rouges indiquent le modèle proposé par Anderson et al., 2008. Le précurseur dimérique reste associé à LTBP avec lequel il est sécrété dans le milieu extracellulaire et séquestré par la matrice extracellulaire. Le précurseur dimérique se libère de LTBP par le clivage effectué par la furine. La myostatine mature et bioactive est libérée après le clivage par BMP1-Tolloïde (Anderson et al., 2008). LTBP : *Latent transforming growth factor* ; BMP : *Bone morphogenetic factor*.

aminés Arg-98 et Asp-99 (Wolfman et al., 2003; Zimmers et al., 2002). L'injection d'une protéine recombinante pour un propeptide muté au niveau de l'Asp-99 chez la souris entraîne une augmentation de la masse de chaque muscle squelettique de 18-27%, ce qui est deux fois plus élevé qu'après injection d'anticorps anti-myostatine (10-16%) (Wolfman et al., 2003). Ces données montrent donc que la présence de l'acide aminé aspartate semble essentiel pour ce clivage ce qui suggère l'implication de membres de la famille de métalloprotéinase BMP1/Tolloïde qui coupent généralement juste avant un résidu aspartate. Les analyses des différents membres de la famille des BMP1/Tolloïde suspecte principalement une implication de TLL2 car son expression est restreinte au muscle squelettique et au cerveau (Scott et al., 1999). Les études ont également pu montrer une activation de la myostatine, à partir du complexe latent purifié, par incubation à 80°C pendant 5min (Wolfman et al., 2003) ou après traitements par des acides (Zimmers et al., 2002).

Bien que la myostatine soit retrouvée en majorité sous sa forme latente LAP dans le sérum, il a été montré qu'elle pouvait également être retrouvée sous une forme précurseur associée à une protéine appelée LTBP (*Latent TGF- β Binding Protein*) au niveau du muscle squelettique (Anderson et al., 2008). La famille des LTBP est constituée des LTBP1 à LTBP4. Ce sont des glycoprotéines sécrétées à multidomaines qui peuvent interagir avec la matrice extracellulaire. LTBP3 est celle qui est la plus exprimée au niveau du muscle squelettique. Le modèle suggéré par l'équipe d'Anderson (Fig. 20) est que LTBP3 se fixe à la promyostatine dès sa translocation dans le réticulum endoplasmique pour former un complexe dit « large » (*Large Latent Complex*) qui sera sécrété tel quel dans le milieu extracellulaire pour être ensuite séquestré dans la matrice extracellulaire. Un clivage extracellulaire par la furine permettrait la libération du précurseur de la partie mature et active de la myostatine (Fig. 20 ; Anderson et al., 2008).

LTBP3 n'est pas la seule molécule régulatrice de la myostatine. La myostatine subit une régulation fine à chaque étape de sa production, que ce soit au niveau génique (régulation du promoteur), transcriptionnel (régulation de la transcription et de la maturation des ARNm), ou protéique (régulation post-traductionnelle et séquestration protéique).

b) Régulations de la myostatine

Régulation transcriptionnelle

Des analyses *in silico* de la séquence promotrice bovines ont permis d'identifier 1 boîte CAAT (-73 à -69-pb) et 3 boîtes TATA dans les 400 paires de bases précédant le site d'initiation de la transcription. Un site de liaison de la protéine MEF2, 10 E-box (sites de liaison de MRF : CANNTG), des sites de liaisons aux protéines AP1 (au nombre de 2), GATA, GATA1, GATA2 et GATA3 sont répartis dans les 1600pb de séquence précédant le site d'initiation de la transcription, nécessaires à la transcription du gène (Spiller et al., 2002). Ces séquences promotrices ont 79% d'homologie avec la séquence humaine, 68% d'homologie avec la séquence murine et 64% d'homologie avec la séquence promotrice porcine. Le nombre d'E-box varie selon l'espèce, 12 chez l'homme, 10 chez le bovin et 8 chez le mouton par exemple, et certaines sont conservées entre espèces (Du et al., 2007; Ma et al., 2001; Spiller et al., 2002). Le promoteur du gène *myostatine* est aussi constitué de séquences spécifiques de liaison de protéines des familles FoxO et SMAD (Allen and Unterman, 2007; Forbes et al., 2006). Les études ont montré une augmentation de l'activité du promoteur du gène *myostatine* en présence de FoxO1, de TGF- β ou de protéines SMADs telles que SMAD2, SMAD3 et SMAD4 (Allen and Unterman, 2007). De plus, SMAD7 joue un rôle dans la régulation négative de l'activité du promoteur du gène *myostatine* (Forbes et al., 2006). Des délétions dans les sites de liaison des protéines FoxO ([C/G][A/T]AAA[C/A]A) dans des constructions plasmidiques contenant le promoteur du gène *myostatine* entraînent une nette diminution de l'activité du promoteur du gène *myostatine* en présence de FoxO1 dans des cellules myoblastiques (Allen and Unterman, 2007). Il est à noter que les promoteurs des gènes *myostatine* bovins et humains semblent répondre à un moindre degré à un signal donné par des protéines de la famille FoxO comparé au promoteur du gène *myostatine* murin (Allen and Du, 2008). Le promoteur du gène *myostatine* murin comporte 4 sites FoxO, tandis que le promoteur du gène *myostatine* bovin en comporte 3 sites (Allen and Du, 2008). L'inactivation du site FoxO supplémentaire murin entraîne une diminution de moitié de l'activité du promoteur (Allen and Du, 2008). De plus, le promoteur du gène *myostatine* murin est significativement plus actif que le promoteur du gène *myostatine* bovin. À partir du même muscle *longissimus dorsi*, alors que le taux de transcrits contrôles de GAPDH est identique, le taux de transcrit du gène *myostatine* est plus faible chez le bovin que chez la souris (Allen and Du, 2008). Enfin, le promoteur du gène *myostatine* murin apparaît 25% plus actif

que le promoteur du gène *myostatine* bovin ou humain dans des cellules C2C12 myoblastiques et 3 fois plus actifs dans des myotubes (Allen and Du, 2008). Ces différences entre espèces de l'activité du promoteur du gène *myostatine* pourraient être expliquées par les différences dans les séquences consensus importantes dans la régulation transcriptionnelle : boîte TATA, séquences CACCC, séquences riches en A/T (Allen and Du, 2008).

En plus de posséder des séquences consensus de liaison à des facteurs de transcription de la famille des MRF, les études *in vitro* ont pu démontrer l'effet de ces liaisons sur l'activité du gène. En effet, il a été montré que MyoD, Myf5 et MEF2 étaient des régulateurs de la transcription du gène *myostatine* (Spiller et al., 2002). MyoD est capable d'activer le promoteur du gène *myostatine* tandis que la myostatine est capable de moduler le taux de MyoD dans des myoblastes *in vitro* (Spiller et al., 2002). De plus, l'activité du promoteur du gène *myostatine* coïncide avec l'expression de MyoD. En effet, l'activité du promoteur du gène *myostatine* est plus élevée en phase G1 du cycle cellulaire qu'en G0 ou qu'en G1/S. L'expression de MyoD qui est absente en phase G0, la plus élevée en G1, diminue en G1/S et réaugmente de la phase S de réplication à la phase M de mitose. Enfin, l'expression de MyoD et de la myostatine coïncident de manière temporelle puisqu'elles ont toutes deux un pic d'expression à 90 jours de gestation chez le bovin (Spiller et al., 2002).

Des analyses *in vitro* de l'activité du promoteur dans des cellules non musculaires ont pu démontrer la nature « muscle-spécifique » du promoteur du gène *myostatine* puisque dans ces cellules non musculaires le gène rapporteur avait une expression 4 fois moins élevée que dans des cellules musculaires (Spiller et al., 2002).

La séquence promotrice humaine contient aussi un site de liaison à la protéine PPAR- γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), une région homologue à la séquence consensus du site de liaison de NF- κ B et deux séquences consensus d'éléments de réponse à l'AMPc (Ma et al., 2001). Selon les espèces, elle peut aussi contenir des éléments de réponses à des hormones comme les androgènes (ARE : *androgen response element*), la progestérone (PRE : *progesterone response element*), les hormones de la thyroïde (TRE : *thyroid hormone response elements*) ou les glucocorticoïdes (GRE : *glucocorticoid response elements*) (Du et al., 2007; Ma et al., 2001). Les glucocorticoïdes sont largement utilisés en médecine pour soigner des maladies allergènes, immunologiques, inflammatoires ou cancéreuses. Cependant, les glucocorticoïdes sont aussi connus pour induire en retour de l'atrophie musculaire. Les analyses *in vitro* ont montré que la

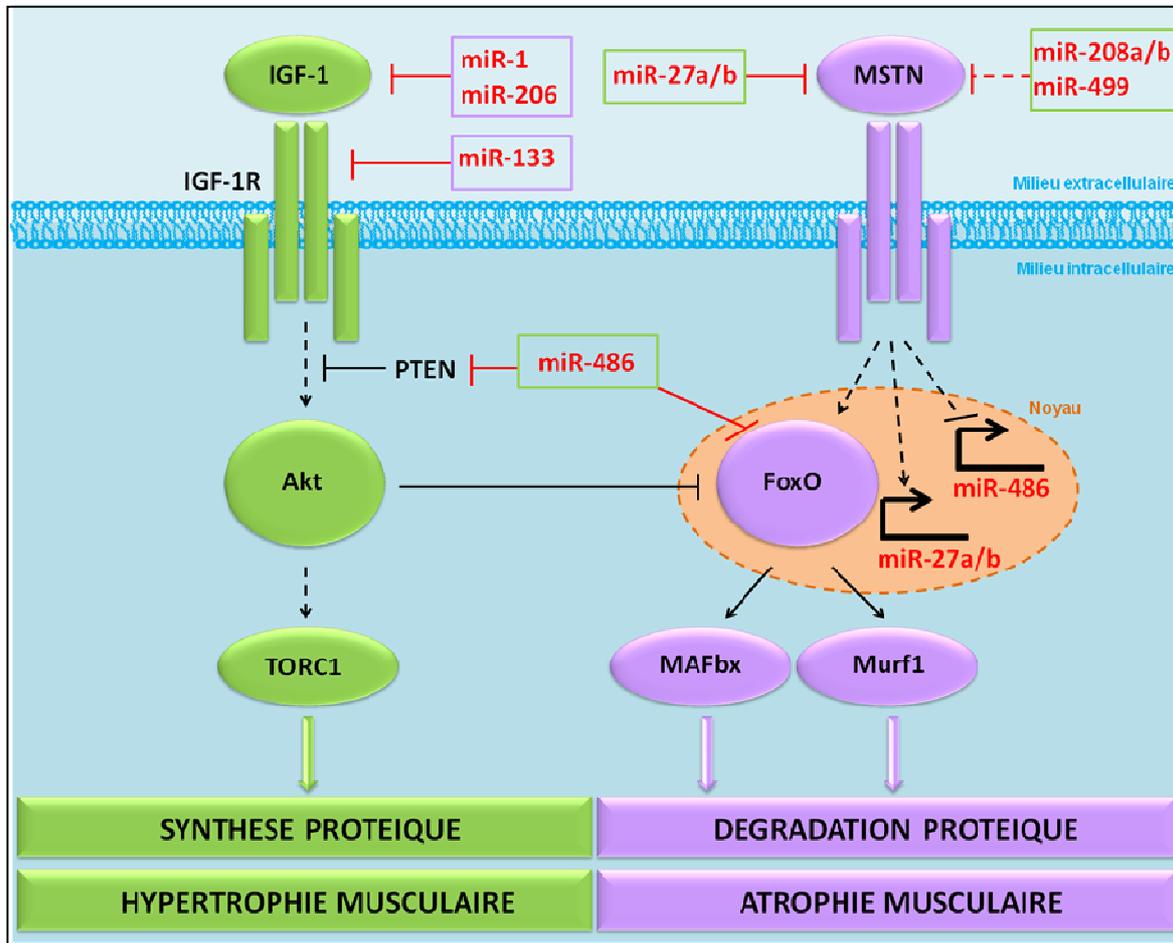


Figure 21 : Schéma des régulations post-transcriptionnelle par les miRNAs du muscle, impliqués dans la balance entre synthèse et dégradation protéique.

MiR-1 et miR-206 inhibe la traduction d'IGF-1. MiR-133 inhibe la traduction d'IGF-1R. En inhibant PTEN, miR-486 permet une régulation positive d'Akt. MiR-486 inhibe la traduction de FoxO. L'expression de miR-486 et miR27a/b sont sous l'influence de la voie de signalisation de la myostatine. La myostatine est elle-même régulée négativement par miR-27a/b, miR-208a/b et miR-499 (modifié de Hitachi and Tsuchida, 2013). MSTN : *myostatin* ; Akt : *Protein kinase B* ; FoxO : *Forkhead box protein O* ; IGF-1 : *Insuline-like growth factor 1* ; IGF-1R *Insuline-like growth factor 1 receptor* ; MAFbx : *Muscle atrophy F-box* ; MuRF1 : *Muscle RING-finger protein 1* ; TORC1 : *mTOR/RAPTOR* ; mTOR : *mammalian target of rapamycin* ; RAPTOR : *Regulatory-associated protein of mTOR* ; PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*.

déexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse, entraîne une augmentation de l'activité du promoteur humain (Ma et al., 2001) et ovin (Du et al., 2007) du gène *myostatine*, de façon dose-dépendante, ce qui conduit à une augmentation du taux de transcrit du gène *myostatine*, à la perte de masse musculaire et à une perte de masse corporelle *in vivo* (Ma et al., 2003). Néanmoins, les analyses effectuées à partir du promoteur murin contredisent ces conclusions puisqu'ils montrent d'une part que l'activité du promoteur n'est pas significativement différente avec ou sans traitement à la déexaméthasone et d'autre part que même si le taux d'ARNm du gène *myostatine* est multiplié par deux, le taux de pré-ARNm est équivalent avec ou sans traitement à la déexaméthasone (Allen and Loh, 2011). Ces conclusions suggèrent donc l'implication de régulations post-transcriptionnelles additionnelles impliquant potentiellement l'action de microARN.

Régulation post-transcriptionnelle par des miRNA

Les microARN (miRNA) sont de petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides d'abord transcrits sous une forme précurseur : pri-miRNA. Les pri-miRNA subissent une série d'étapes de maturations qui permettront la production de ces petits ARN. Les miRNA ciblent des séquences spécifiques de 7 à 9 nucléotides dans les séquences 3'UTR de leurs gènes cibles. Par complémentarité totale ou partielle, les miRNA sont capables d'inhiber la traduction des transcrits cibles par répression ou dégradation du transcrit. Les miRNA jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'expression génique au cours de processus biologiques tels que l'homéostasie, la prolifération, la différenciation, la régénération cellulaire et la tumorigénèse impliqués dans des processus physiologiques au cours du développement et à l'âge adulte comme la croissance musculaire. Des miRNA spécifiques du muscle ont été identifiés, se sont les myomiR dont font partie : miR-1, miR-133a/b, miR-206, miR-208a/b, miR-499, et miR-486. Certains d'entre eux sont impliqués dans la régulation de la voie IGF-1/Akt, tandis que d'autres sont impliqués dans la régulation de la voie canonique de la myostatine via les SMADs (Fig. 21 ; pour revue, Hitachi and Tsuchida, 2013).

MiR-208a/b et miR499 proviennent de séquences géniques introniques de gènes codants pour la chaîne lourde de la myosine (MYH), les gènes *myh6*, *myh7* et *myh7b* respectivement. MiR-208a est exclusivement exprimé dans le muscle cardiaque tandis que miR-208b et miR-499 sont exprimés dans le muscle cardiaque et squelettique. Le gène *myostatine* contient des sites cibles potentiels de ces miRNA dans sa séquence 3'UTR.

La surexpression de miR-208a dans le muscle cardiaque entraîne une hypertrophie musculaire du cœur. Les auteurs ont démontré *in vitro* que ce phénotype est associé à une inhibition des transcrits du gène *myostatine* par miR-208a (Callis et al., 2009).

Bien que le gène *myostatine* contienne des sites cibles potentiels des miRNA miR-208b et miR-499, l'association directe entre ces miRNA et les transcrits du gène *myostatine* n'est pas claire, même si leur rôle dans la croissance musculaire est indéniable (Bell et al., 2010; Callis et al., 2009). Néanmoins, il a été montré qu'après une ingestion d'acides aminés essentiels l'expression de ces miRNA est augmentée tandis que l'expression du gène *myostatine* est diminuée (Drummond et al., 2009).

MiR-27a et miR-27b sont deux miRNA non spécifiques du muscle également impliqués dans le contrôle de la croissance musculaire et ayant une séquence cible potentielle dans la région 3'UTR du gène *myostatine*. Il a été montré une surexpression de miR-27b dans le tissu musculaire d'animaux de race bovine Piémontaise hypermusclée qui pourrait être corrélée avec la baisse du taux de protéine myostatine observée (Miretti et al., 2013). Les analyses *in vitro* ont confirmé que miR27a et b sont capables de s'associer à leur séquence cible dans la région 3'UTR du gène *myostatine*, afin de réguler directement la stabilité et la traduction de la myostatine et de moduler ainsi positivement la prolifération cellulaire (Allen and Loh, 2011 ; Huang et al., 2012; McFarlane et al., 2014; Miretti et al., 2013; Yang et al., 2014). L'expression de miR-27a et b serait régulée par la myostatine elle-même *via* sa voie de signalisation canonique des SMADs, ce qui met en évidence une nouvelle boucle de rétrocontrôle négatif de la myostatine (McFarlane et al., 2014). En outre, en plus d'un effet positif des glucocorticoïdes sur l'expression de la myostatine, il a été montré un effet négatif sur l'expression de miR-27a, dont le taux de transcrit est divisé par deux après traitement à la dexaméthasone (Allen and Loh, 2011).

Enfin, comme décrit précédemment, miR-1 et miR-206 sont capables de réprimer la traduction de la myostatine en s'appariant à leur site cible illégitime créée après une mutation dans la séquence 3'UTR du gène *myostatine* chez le mouton Texel (Clop et al., 2006).

Ces données montrent donc que la régulation post-transcriptionnelle du gène *myostatine* par les miRNA est un élément majeur dans la régulation de l'expression de la myostatine. Néanmoins, une fois la myostatine produite, elle interagit avec d'autres protéines capables

d'empêcher sa fixation sur son récepteur par séquestration intracellulaire, dans la matrice extracellulaire ou dans le milieu extracellulaire et/ou dans le sérum.

Régulation post-traductionnelle de la myostatine

Séquestration intracellulaire

Certaines protéines sont capables d'interagir avec la myostatine de façon intracellulaire afin d'en limiter sa sécrétion, c'est le cas de la téléthonine aussi appelée titin-cap (T-cap) et la protéine hSGT (*human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein*) (Nicholas et al., 2002; Wang et al., 2003).

La téléthonine est une protéine sarcomérique exprimée dans le muscle cardiaque et squelettique (Valle et al., 1997). Elle est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette au cours de la myofibrillogénèse et joue un rôle dans le maintien des myofibrilles. Des mutations dans le gène téléthonine peuvent entraîner l'apparition de la dystrophie musculaire des ceintures de type 2G (Moreira et al., 1997, 2000). Les études d'interaction, par un système double hybride chez la levure, ont montré que la téléthonine est capable d'interagir avec la partie C-terminal bioactive de la myostatine dans des cellules C2C12 afin d'en inhiber sa sécrétion ; les cellules C2C12 surexprimant la téléthonine prolifèrent plus vite que les cellules contrôles et sécrètent un taux moins élevé de myostatine (Nicholas et al., 2002).

La protéine hSGT est ubiquitaire chez l'homme. Elle joue un rôle chaperon dans la maturation et la conformation protéique. Les études d'interaction, là encore par un système double hybride chez la levure, ont montré que l'hSGT pouvait interagir avec la partie N-terminale de la promyostatine, soit les 23 premiers acides aminés constituant le peptide signal. Ainsi, l'hSGT modulerait la sécrétion de la myostatine (Wang et al., 2003).

Séquestration dans la matrice extracellulaire

La décorine est un membre de la famille des petits protéoglycanes riches en leucine (SLRP : *Small Leucine-Rich Proteoglycan*). Elle est constituée d'un cœur protéique composé de séquences de leucines répétées et d'une chaîne de glucosaminoglycane (macromolécules glucidiques formant d'importants composants des matrices extracellulaires des tissus conjonctifs) de type dermatane (cartilage élastique, cartilage hyalin, os, derme, cornée) /chondroïtine sulfate (derme, tendon, ligament, cartilage fibreux). La décorine se lie à certaines fibrilles de collagène

de la matrice extracellulaire afin de stabiliser les fibres de collagène. Des études *in vitro* ont pu montrer que des cellules C2C12 ne produisant plus de décorine présentaient une accélération du processus de différenciation terminale avec une augmentation de l'expression de la myogénine et de la créatine kinase (Riquelme et al., 2001). Par la technique de résonance plasmonique de surface, les études ont montré que la décorine est capable d'agir sur la croissance cellulaire en se liant à la myostatine afin de la séquestrer dans la matrice extracellulaire pour l'empêcher d'interagir avec son récepteur (Miura et al., 2006). Après une blessure, les souris déficientes pour le gène *myostatine* présentent un retard dans la cicatrisation de la peau généré par un retard dans la ré-épithélisation de l'épiderme et dans la contraction cutanée. Ces souris déficientes pour le gène *myostatine* présentent une augmentation du taux d'expression de la décorine, ce qui entrainerait une inhibition de TGF- β -1 et l'apparition de ces défauts de cicatrisation (Zhang et al., 2012a).

Par la technique de résonance plasmonique, les études ont aussi pu mettre en évidence une interaction entre la laminine, protéine de la matrice extracellulaire, avec la myostatine et/ou son récepteur ActRIIB afin de réguler sa voie de signalisation (Yasaka et al., 2013).

Séquestration dans le sérum

La protéine follistatine, FLRG (*Follistatin-Related Gene*), GASP1 (*Growth and differentiation associated serum protein 1*) et le propeptide de la myostatine peuvent se lier au complexe C-terminal dimérique de la myostatine circulante dans le sang afin d'inhiber la liaison de la myostatine à son récepteur (Hill et al., 2002, 2003; Lee and McPherron, 2001; Zhu et al., 2004; Zimmers et al., 2002).

Des souris surexprimant la follistatine peuvent avoir une masse musculaire supérieure de 327% par rapport à une souris normale (Lee and McPherron, 2001). En revanche, des souris déficientes pour la follistatine présentent un retard de croissance et des défauts du système musculo-squelettique avec une diminution de la masse des muscles (Matzuk et al., 1995).

Dans le sang, la myostatine dimérique est à 70% liée à son propeptide sous la forme latente (Hill et al., 2002). Des souris surexprimant le propeptide peuvent avoir une masse musculaire atteignant 110% (Lee and McPherron, 2001; Yang et al., 2001). Par contre, ces souris surexprimant le propeptide présentent une masse grasseuse moins importante que les souris normales (Yang et al., 2001).

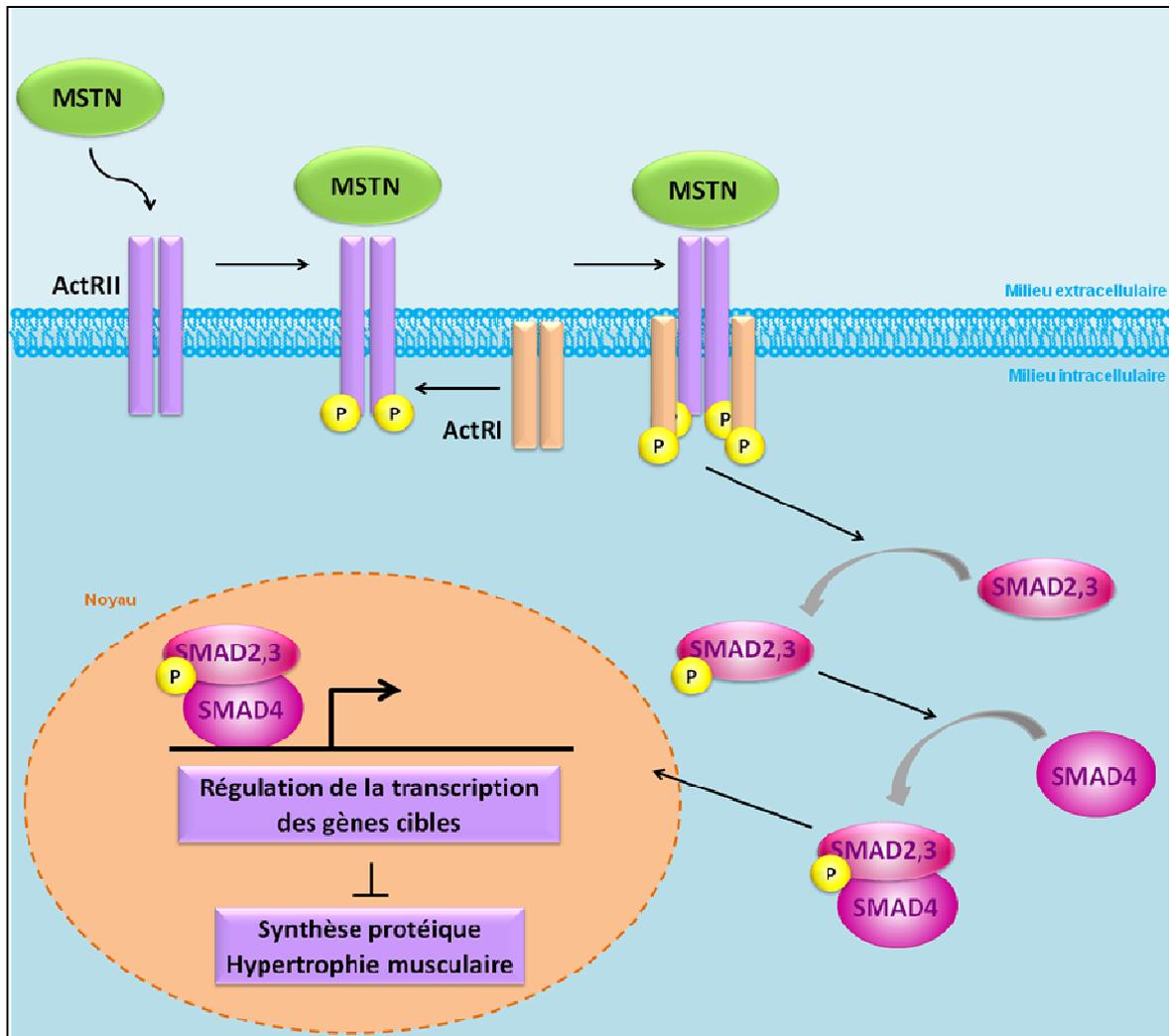


Figure 22 : Schéma de la voie de signalisation canonique de la myostatine.

La myostatine se fixe sur son récepteur à Activine, ActRII. ActRII s'autophosphoryle et permet le recrutement du récepteur secondaire ActRI qui va lui-même s'autophosphoryler et permettre la phosphorylation des R-SMADs, SMAD2 et SMAD3. SMAD2 et SMAD3 phosphorylés recrutent le co-SMAD, SMAD4. Ce complexe ainsi formé transloque dans le noyau et régule la transcription de gènes cibles dans le but d'inhiber la synthèse protéique et prévenir un développement musculaire excessif. SMAD : *Sma mothers against decapentaplegic*. P : Phosphorylation.

Il a été suggéré que les transcrits alternatifs identifiés chez le crabe *Gecarcinus lateralis*, le poulet, le canard, le mouton, le dauphin, le porc et la vache, qui produisent une protéine tronquée de sa partie bioactive, auraient un rôle physiologique dans la régulation négative de la myostatine en se comportant comme un propeptide (Castelhano-Barbosa et al., 2005; Covi et al., 2008; Garikipati et al., 2007; Jeanplong et al., 2013). Cette hypothèse est également émise dans le cas de certaines mutations identifiées dans le gène *myostatine*, qui entraînent la production d'une protéine tronquée de sa partie bioactive. C'est notamment le cas de la mutation C313Y identifié chez la race bovine Piémontaise (Berry et al., 2002).

Ces différents moyens de réguler la myostatine permettent de contrôler finement les voies de signalisation induites par la myostatine. En effet, la signalisation induite par la myostatine passe par des processus complexes essentiels dans la régulation de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de l'apoptose mais aussi dans l'inhibition de la synthèse protéique.

c) Signalisation

Voie canonique des SMADs

La myostatine mature et active agit de façon autocrine et paracrine et se lie aux récepteurs à activité sérine/thréonine kinase ActRIIB ou ActRIIA (avec une affinité moindre) de ses cellules cibles (Fig. 22 ; Lee and McPherron, 2001; Rebbapragada et al., 2003; Sartori et al., 2009). Des souris transgéniques pour le gène ActRIIB muté de son domaine kinase présentent une hypermusculature avec une masse musculaire 125% supérieure à une souris normale (Lee and McPherron, 2001). Une fois activé, le récepteur de type II s'autophosphoryle ce qui permet le recrutement d'un second récepteur, de type I, Alk4 ou Alk5 (Fig. 22 ; Rebbapragada et al., 2003; Sartori et al., 2009; Trendelenburg et al., 2009). Ce complexe s'autophosphoryle à son tour et entraîne la phosphorylation des R-SMADs (*receptor-regulated Smads*), SMAD2 et SMAD3 (Fig. 22 ; Rebbapragada et al., 2003; Sartori et al., 2009; Trendelenburg et al., 2009). SMAD2 et SMAD3 ainsi activés forment un complexe hétéro-oligomériques synergique avec le Co-SMAD (*common-partner Smad*) SMAD4, qui est transloqué dans le noyau (Fig. 22). Le complexe SMAD2/3/4 peut interagir avec différents partenaires activateurs ou répresseurs de la transcription, mais peut aussi se lier à l'ADN pour réguler directement la transcription de gène cible (Fig. 22 ; Zhu et al., 2004). L'un des gènes cibles de ce complexe est l'I-SMAD (*inhibitory SMAD*) SMAD7. Les analyses *in vitro* ont pu montrer une induction 4 fois plus élevée de

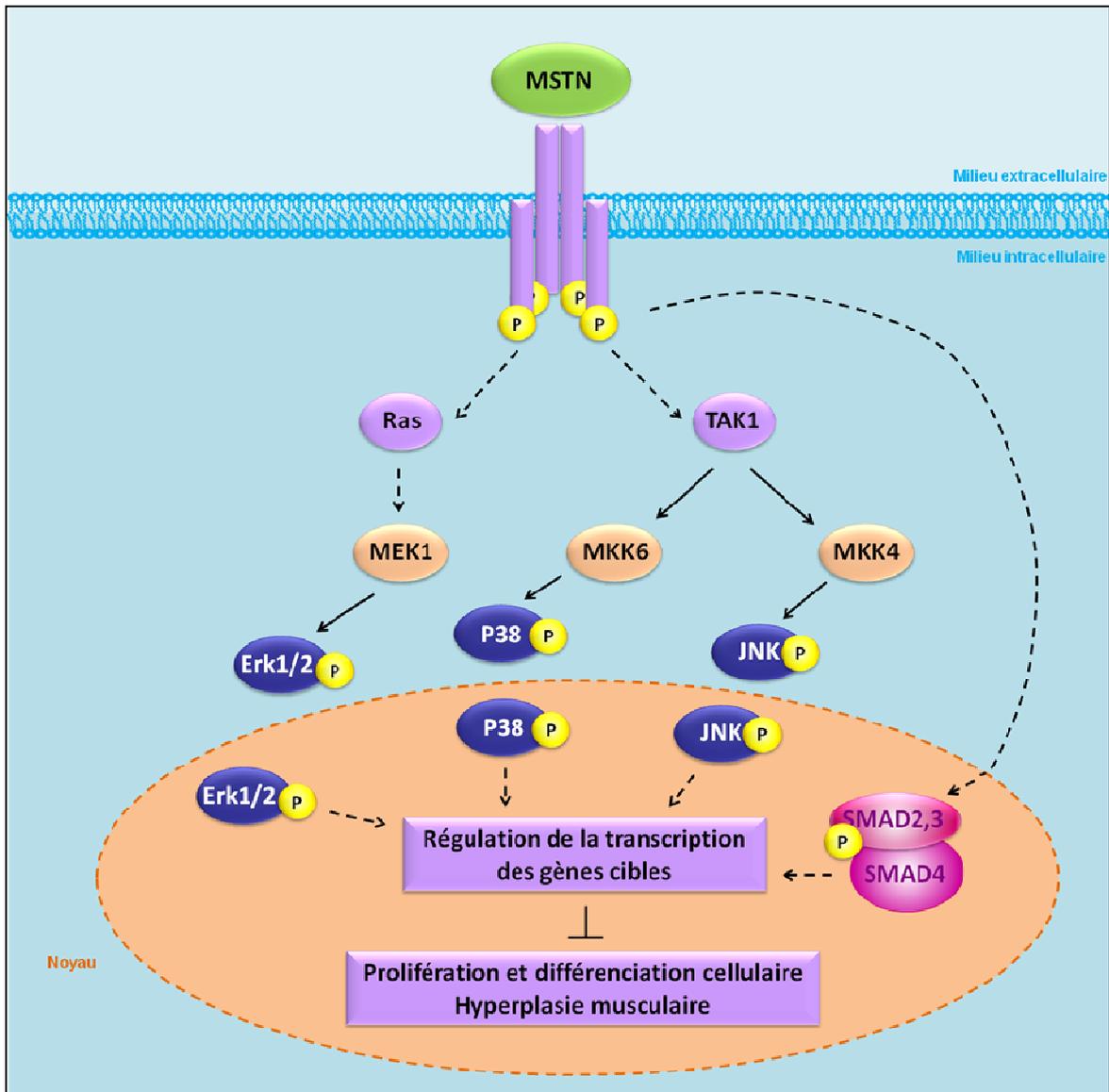


Figure 23 : Schéma des voies de signalisations induites par la myostatine et impliquées dans l'inhibition des processus myogéniques.

La myostatine active les voies de signalisation de MAPK P38, de Ras/MEK1/Erk1/2 et de JNK, qui induisent une inhibition des processus myogéniques tels que la prolifération et la différenciation cellulaire. MSTN : *myostatin* ; TAK1 : *TGF-beta activated kinase 1* ; MEK1 : *mitogen-activated protein kinase kinase 1* ; MKK4 & 6 : *mitogen-activated protein kinase kinase 4 & 6* ; JNK : *Jun kinase* ; SMAD : *Sma mothers against decapentaplegic*. P : Phosphorylation.

l'activité du promoteur de Smad7 après injection d'une myostatine recombinante dans le milieu de culture de cellules C2C12 (Forbes et al., 2006). Il s'agit d'une boucle de rétrocontrôle négative puisque la myostatine entraîne une régulation positive de l'expression de SMAD7, qui lui-même entraîne une régulation négative de la myostatine (Forbes et al., 2006; Zhu et al., 2004). Plusieurs mécanismes d'actions de SMAD7 dans la régulation négative de la myostatine ont été suggérés. Tout d'abord, SMAD7 aurait un rôle dans la régulation de l'activité du promoteur du gène *myostatine* (Forbes et al., 2006). Ensuite, Smad7 interagirait avec d'autres protéines dans le but d'empêcher la phosphorylation du récepteur de la myostatine (Shi et al., 2004) et/ou entrainerait sa dégradation par ubiquitinylation (Murakami et al., 2003). Enfin, SMAD7 régulerait négativement la myostatine en formant un complexe hétéro-oligomérique avec SMAD2/3, qui entrerait en compétition avec le complexe SMAD2/3/4 et empêcherait la propagation du signal (Zhu et al., 2004).

Une analyse par Northern blot ciblant les transcrits du gène *myostatine* a pu montrer que les animaux hypermusclés de la race bovine Blanc Bleu Belge, présentant l'allèle avec la mutation perte de fonction, produisent un taux relativement plus élevé de transcrit du gène *myostatine* comparé au taux observé chez des animaux normaux (Forbes et al., 2006). Ces résultats dénotent un défaut dans la boucle de rétrocontrôle SMAD7/myostatine ; si les transcrits du gène *myostatine* aboutissent à la production d'une protéine non fonctionnelle, alors la voie de signalisation de la myostatine entraînant la production de son inhibiteur SMAD7 ne peut être activée, SMAD7 ne peut donc pas être produit ni inhiber à son tour la production de myostatine. Cette hypothèse a été démontrée *in vitro* par l'ajout de myostatine recombinante dans le milieu de culture de myoblastes bovins. L'analyse par Northern blot a montré une diminution d'un facteur 2 du taux relatif de myostatine et une analyse du promoteur a montré une diminution de 58% de son activité alors que cette activité promotrice n'est pas significativement diminuée après l'ajout de myostatine non fonctionnelle possédant la mutation C313Y (Forbes et al., 2006). En revanche, l'ajout de cette myostatine non fonctionnelle ne permet pas l'activation du promoteur de SMAD7 (Forbes et al., 2006).

Autres voies de signalisation

La voie P38 MAPK joue un rôle crucial dans plusieurs processus cellulaires au cours du développement, de la différenciation et de la prolifération cellulaire et dans l'apoptose. La myostatine serait capable d'activer une voie de signalisation médiée par la MAPK P38 (Fig. 23)

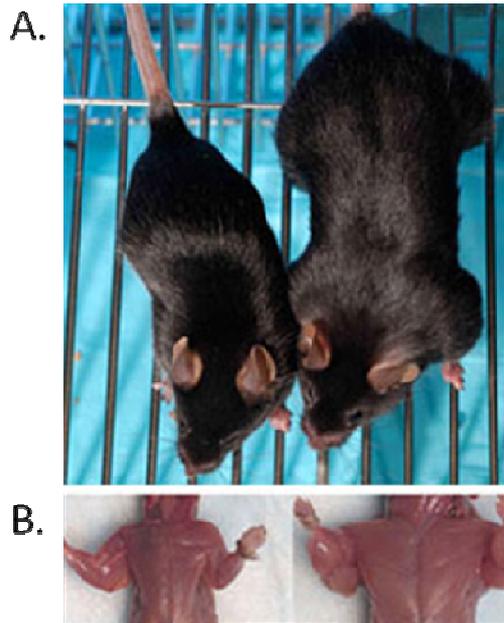
de façon indépendante de sa voie de signalisation canonique elle-même médiée par les protéines de la famille des SMADs dans des cellules C2C12 et A204. Le récepteur de type I de la myostatine (Alk5/ActRI) serait capable d'activer MAPKKK TAK1, qui elle-même activerait la MAPKK MKK6, qui enfin activerait la MAPK P38 (Fig. 23 ; Philip et al., 2005). P38 phosphorylée est ensuite transloquée dans le noyau où elle module la transcription de ses gènes cibles tels qu'ATF2 et MEF2C. Les analyses suggèrent que P38 activée agirait sur l'affinité de liaison de SMAD3 avec l'ADN et/ou par ATF2 qui est capable d'interagir avec SMAD3 (Philip et al., 2005). Ainsi, la voie de signalisation associée à l'activation de P38 agirait de façon synergique avec la voie canonique de la myostatine dans la régulation de la prolifération cellulaire (Philip et al., 2005).

L'implication de la voie P38 MAPK dans la voie de transduction du signal de la myostatine a donné l'idée aux chercheurs d'analyser l'implication des deux autres voies des MAPK ; les voies impliquant les protéines Erk et JNK. La transduction du signal inhibiteur de la myostatine sur la prolifération et la différenciation cellulaire semble également passer par la voie Ras/MEK1/Erk1/2 à travers le Récepteur de type II ActRIIB (Fig. 23 ; Yang et al., 2006). La voie de signalisation impliquant JNK semble elle aussi avoir des effets synergiques avec la voie des SMAD dans l'inhibition de la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose de cellules C2C12, après liaison de la myostatine à son récepteur (Fig. 23 ; Huang et al., 2007). Une nouvelle fois à travers le récepteur ActRIIB, la myostatine transduit un signal qui conduit à l'activation par phosphorylation de la MAPKKK TAK1, qui va permettre l'activation de la MAPKK MKK4 puis l'activation de la MAPK JNK (Fig. 23). Au cours de la prolifération cellulaire, cette voie de signalisation va permettre l'augmentation de la protéine P21, inhibiteur de la cycline kinase Cdk2 et entraîner l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1-S. De plus, cette augmentation du taux de P21 joue un rôle dans l'inhibition de l'apoptose. Au cours de la différenciation cellulaire, cette voie de signalisation permet l'inhibition de facteurs myogéniques comme MyoD et la myogénine (Huang et al., 2007). Il est à noter que ces deux processus se font toujours en parallèle des processus induits par la voie des SMADs.

Les analyses ont montré une transduction du signal de la myostatine à travers Alk5 pour l'activation de la voie de signalisation impliquant P38 (Philip et al., 2005) et une transduction du signal de la myostatine à travers ActRIIB pour l'activation des voies de signalisation impliquant Erk1/2 et JNK (Huang et al., 2007; Yang et al., 2006). À aucun moment la non-implication

d'ActRIIB dans l'activation de la voie de signalisation impliquant P38 ou ActRI dans l'activation de la voie de signalisation impliquant Erk1/2 et JNK n'a pu être démontrée. De plus, P38 et JNK ayant un activateur commun (TAK1), ces données suggèrent que ces trois voies de signalisation sont induites par la myostatine à travers le récepteur ActRIIB qui va ensuite recruter et activer ActRI et transduire le signal.

Enfin, des analyses *in vitro* sur une lignée myoblastique humaine (HuSkMC) ont mis en évidence un effet de la myostatine sur la voie de signalisation d'IGF-1 médiée par la PI3K/Akt (Trendelenburg et al., 2009). La fixation d'IGF-1 sur son récepteur entraîne l'activation de la PI3K qui va elle-même permettre l'activation d'Akt par phosphorylation (Fig. 8). Akt activée entraîne i) l'inhibition de facteurs de transcription de la famille FoxO qui permettent l'activation des E3 ubiquitine ligase MuRF-1 et MAFbx impliquées dans la dégradation protéique et l'atrophie musculaire (Fig. 8), ii) l'activation du complexe TORC1 (mTOR/RAPTOR) impliqué lui dans la synthèse protéique et l'hypertrophie musculaire (Fig. 8 ; Latres et al., 2005). Un autre complexe, TORC2 (mTOR/RICTOR) joue un rôle de régulateur positif de l'activation d'Akt en étant capable de le phosphoryler (Sarbasov et al., 2005). Le traitement des cellules HuSkMC avec la myostatine entraîne *via* SMAD2/3, une diminution de la quantité d'Akt activée, une diminution de FoxO1 phosphorylée et l'inhibition de la différenciation cellulaire (Trendelenburg et al., 2009). La diminution d'Akt phosphorylée entraîne donc une accumulation de FoxO1 active puisque déphosphorylée, ce qui va permettre entre autres l'activation des E3 ubiquitine ligase MuRF-1, MAFbx (Atrogin-1) impliquées dans la dégradation protéique et l'atrophie musculaire (Fig. 8 ; McFarlane et al., 2006). L'ajout d'IGF-1 à ces cellules prétraitées par la myostatine permet de rétablir le processus de différenciation cellulaire inhibée par la myostatine en restaurant le taux d'Akt phosphorylée et en bloquant l'inhibition de facteurs myogénique tels que MyoD et la myogénine (Trendelenburg et al., 2009). Il est à noter que le complexe TORC1, capable d'inhiber la phosphorylation de SMAD2, est lui-même activé et constitue une boucle de rétrocontrôle positif d'activation d'Akt (Trendelenburg et al., 2009). En outre, l'effet dominant d'IGF-1 sur celui de la myostatine peut être expliqué par cette boucle de rétrocontrôle : en plus de restaurer le taux d'Akt activé, IGF-1 permet d'inhiber la voie de signalisation de la myostatine par l'inhibition de l'activation de SMAD2. Enfin, par sa voie de signalisation canonique des SMADs, la myostatine peut inhiber l'expression de microARN (miRNA) tel que miR486 (Fig. 21). MiR486 joue un rôle dans la régulation positive de la voie Akt ce qui entraîne



Etudes aFigure 24 : Photos de souris déficientes pour le gène *myostatine*.

A, Une souris sauvage (gauche) et une souris déficiente (droite) pour le gène *myostatine*. **B**, Souris sauvage (gauche) et déficiente pour le gène *myostatine* (droite) dont la peau a été retirée. On observe une forte musculature pour les souris déficientes pour le gène *myostatine* (photos : Se-Jin Lee).

une diminution de la dégradation protéique et prévient de l'atrophie musculaire (Hitachi et al., 2014).

4. Rôle biologique

Afin de comprendre le rôle biologique de la myostatine, les auteurs ont réalisé des études fonctionnelles qui ont permis de déterminer sa fonction dans le muscle squelettique au cours de la myogenèse pré et post-natal, mais aussi dans le tissu adipeux.

a) Dans le muscle squelettique

Pour déterminer la fonction biologique de la myostatine, des expériences de recombinaison homologues dans des cellules souches embryonnaires de souris ont permis à la région C-terminale d'être enlevée et remplacée par une cassette « *neo* ». Ceci a conduit à la génération d'homozygotes mutants 25-30% plus large que les hétérozygotes et les sauvages de la même portée de façon constante et indépendante de l'âge et du sexe mais dû à l'augmentation de la masse musculaire sur l'ensemble du corps (Fig. 24). Le poids d'un muscle pouvait être 2 à 3 fois plus élevé (soit 200 à 300%) chez le mutant que chez le sauvage. Des analyses histologiques ont montré qu'à la fois une hyperplasie et une hypertrophie étaient à l'origine de cette augmentation de masse musculaire (McPherron and Lee, 1997; McPherron et al., 1997). Il est à noter qu'en race bovine Blanc Bleu Belge, la masse musculaire est 20-25% plus élevée alors que chez la souris, la masse musculaire est plus élevée de 200-300%. Cette différence peut s'expliquer par la sélection bovine qui aurait limitée la taille maximale des muscles bovins contrairement à la souris où aucune sélection n'a été faite. La deuxième hypothèse proposée par les auteurs est que cette différence phénotypique serait due à la différence de deux acides aminés entre le bovin et la souris, qui pourrait entraîner chez le bovin l'existence d'une perte de fonction partielle à étudier (McPherron and Lee, 1997). Au contraire, l'injection de myostatine chez la souris entraîne une perte de la masse totale du corps de 33%, avec une diminution de la masse musculaire de 35% à 50% (Zimmers et al., 2002). La myostatine est donc un régulateur négatif du développement musculaire qui semble jouer un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire du muscle squelettique au cours du développement (McPherron et al., 1997).

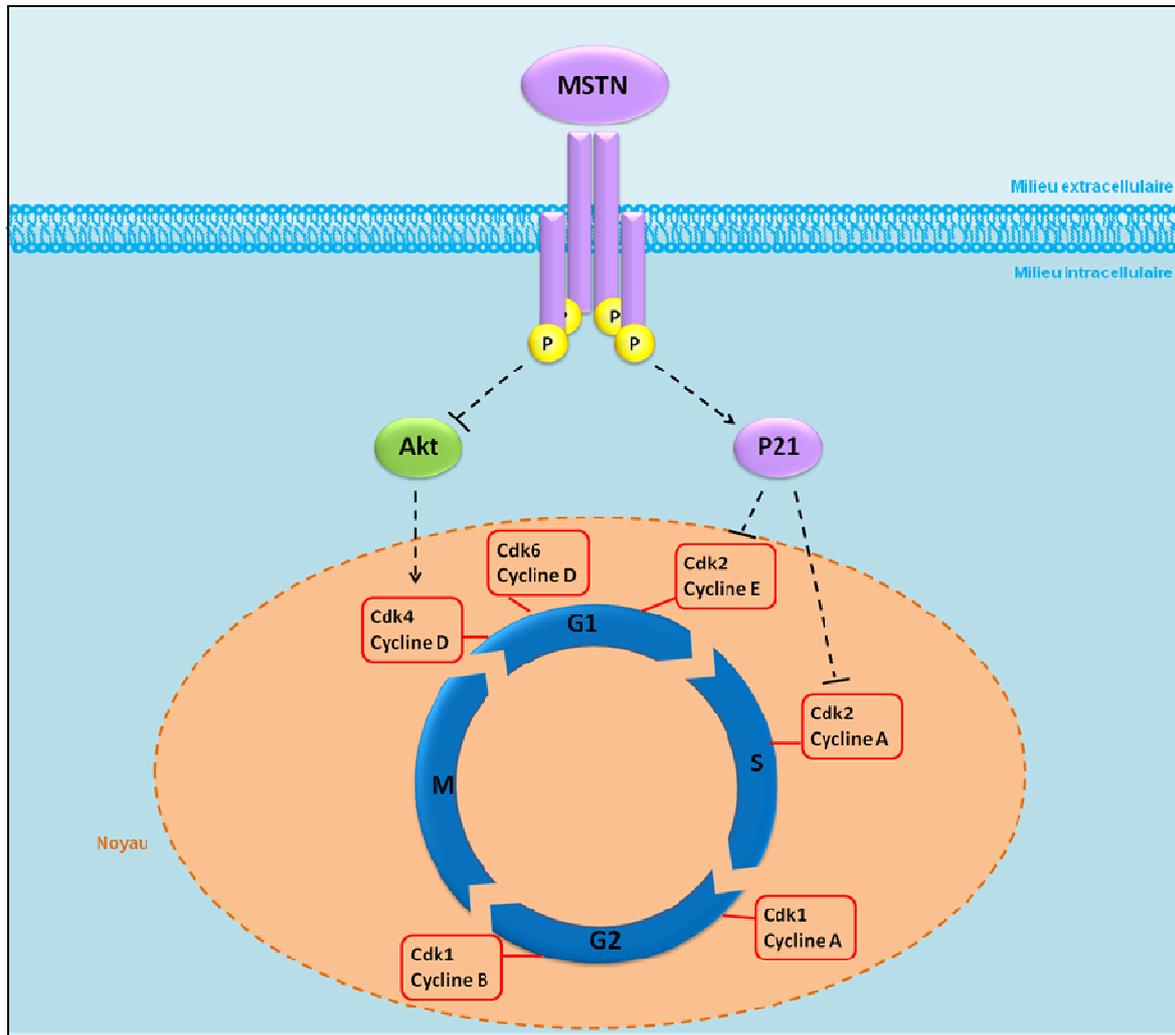


Figure 25 : Schéma du rôle de la myostatine sur le cycle cellulaire au cours de la myogenèse.

La myostatine induit une inhibition d'Akt ce qui entraîne une diminution du taux de cycline D et de Cdk4 et le blocage du cycle cellulaire en phase G1. La myostatine entraîne une augmentation du taux de P21, une diminution de Cdk2 et le blocage du cycle cellulaire en phase G1-S. Ces blocages entraînent une diminution de la prolifération cellulaire. MSTN : myostatine ; Akt : Protéine kinase B ; P21 : Protéine 21 ; Cdk : *Cyclin-dependant kinase*.

Au cours du développement prénatal, la myostatine est préférentiellement exprimée dans les fibres musculaires glycolytiques rapides de type IIB (Carlson et al., 1999). Au contraire, les miRNA inhibiteurs post-transcriptionnels du gène *myostatine*, miR-27a et b, sont plus largement exprimés dans les fibres lentes de types I, ce qui pourrait expliquer le profil d'expression de la myostatine observé dans les fibres musculaires glycolytiques rapides de type IIB par rapport à celui observé dans les fibres musculaires oxydatives de type I (Allen and Loh, 2011). Les souris déficientes pour le gène *myostatine* âgées de 39 jours post-nataux présentent une proportion plus large de fibres musculaires glycolytiques rapides de types IIB par rapport aux fibres musculaires oxydatives lentes de types I, comparées aux souris sauvages (Girgenrath et al., 2005). Par ailleurs, l'injection d'anticorps anti-myostatine chez une souris adulte de douze semaines n'entraîne pas de différences dans la composition des différents types de fibres musculaires (Girgenrath et al., 2005) ni dans le nombre de fibres musculaires (Bogdanovich et al., 2002; Whittemore et al., 2003). Ces analyses suggèrent donc que la présence d'une plus grande quantité de fibres de type IIB par rapport aux fibres de types I chez les souris déficientes pour le gène *myostatine* serait dû à l'absence de myostatine au cours du développement prénatal et non au cours du développement post-natal. Ces données appuient le fait que la myostatine est impliquée dans la détermination du nombre de fibres musculaires formées au cours du développement prénatal jusqu'à la naissance chez certaines espèces (nombre qui n'est pas modifié après la naissance) mais également dans la composition du muscle par les différents types de fibres musculaires. Néanmoins, la taille des fibres quant à elle peut être modifiée de façon post-natale, et la myostatine exprimée au cours du développement post-natal peut jouer un rôle dans la croissance des fibres musculaires.

En conséquence, l'hypertrophie et l'hyperplasie musculaire observées chez les souris invalidées pour le gène *myostatine* ainsi qu'une expression précoce de ce gène au cours du développement (McPherron et al., 1997) vont dans le sens d'un rôle de la myostatine i) dans la prolifération des myoblastes et de la différenciation des myocytes en myotubes au cours de la myogenèse, ii) dans la composition du muscle squelettique en fibres de types lentes ou rapides au cours du développement prénatal et iii) dans la croissance et la régénération des fibres musculaires après la naissance.

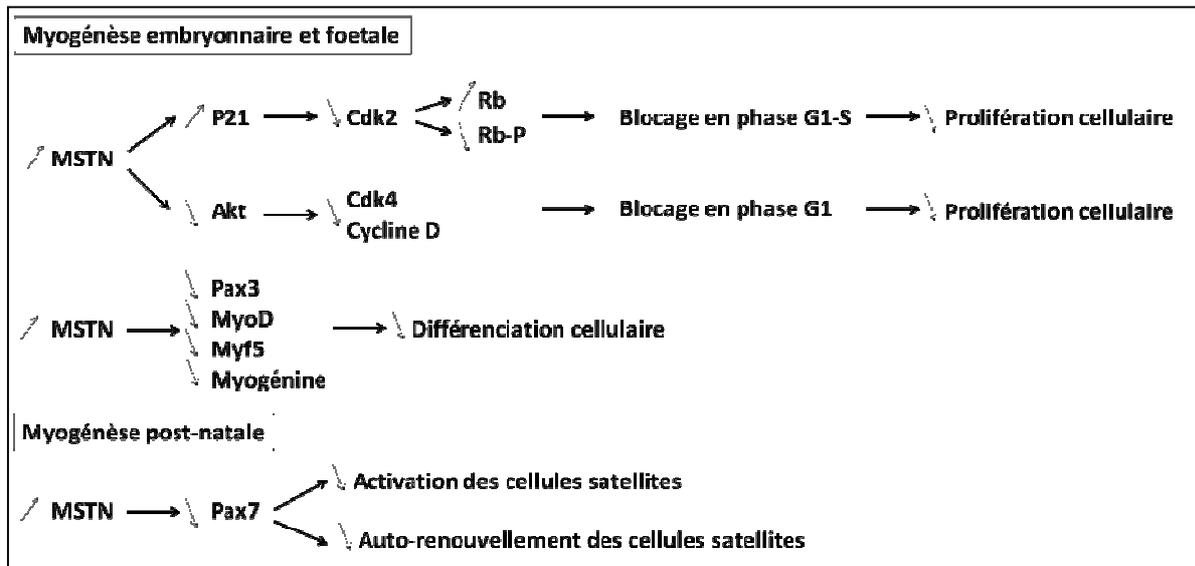


Figure 26 : Schéma du rôle de la myostatine sur les processus myogénique en pré et post-natal.

MSTN : myostatine ; P21 : protéine 21 ; Cdk : *cyclin-dependant kinase* ; Rb : rétinoblastome ; Akt : protéine kinase B ; Pax : *paired-box* ; Myf : *myogenic factor* (modifié de Rodriguez et al., 2014).

Au cours de la myogenèse

Il a été montré que la myostatine est exprimée naturellement dans les myoblastes où elle subit des modifications post-traductionnelles (Ríos et al., 2001; Thomas et al., 2000). Par l'utilisation d'une myostatine recombinante, ces auteurs ont pu montrer *in vitro* que la myostatine inhibe la prolifération des myoblastes de façon dose-dépendante, ainsi que la réplication de l'ADN et la synthèse protéique (Ríos et al., 2001; Taylor et al., 2001; Thomas et al., 2000). Ces études confirment les résultats obtenus par l'équipe de Gerrard et Judge au début des années 90 (Gerrard and Judge, 1993) qui avaient mis des cellules myoblastiques (lignée L6 myoblastique) en culture en présence de sérum de veau fœtal issu de bovin de race Blanc Bleu Belge. Ils avaient alors remarqué une induction plus importante de la prolifération de ces myoblastes. On comprend bien aujourd'hui que cette augmentation de la prolifération myoblastique était due à la myostatine non fonctionnelle (non connue à l'époque) présente dans ce sérum.

Au cours de la myogenèse, les myoblastes prolifèrent puis sont bloqués au stade G1 du cycle cellulaire. Les cellules expriment ensuite des protéines spécifiques du muscle pour fusionner et former des myotubes. Une petite fraction de cellules entrera néanmoins en apoptose.

La myostatine contrôle la prolifération des myoblastes en bloquant le cycle cellulaire en G1 (inhibe la transition en phase S de réplication de l'ADN ; Fig. 25). La myostatine influence positivement l'expression de P21 (Huang et al., 2007; Joulia et al., 2003; Philip et al., 2005; Thomas et al., 2000). P21 étant un inhibiteur des cyclines-cdk, son augmentation entraîne une diminution de cdk2 et de son activité ainsi que du taux de phosphorylation de la protéine Rb (Fig. 25 et 26). Cette phosphorylation est nécessaire pour libérer E2F complexé avec la protéine Rb non phosphorylée. Sans phosphorylation de la protéine Rb, E2F ne peut pas être libérée, ce qui conduit au blocage des myoblastes en G1/S et à l'inhibition de l'apoptose (Fig. 25 ; Joulia et al., 2003; Thomas et al., 2000). En effet, le rôle connu de P21 en tant qu'inhibiteur de l'apoptose (Wang and Walsh, 1996) peut expliquer l'inhibition du taux d'apoptose en cas de surexpression de la myostatine (Joulia et al., 2003; Ríos et al., 2001). Une autre étude a mis en évidence le fait que la myostatine pouvait également jouer sur l'activité de cdk4 et sur le taux de cycline D *via* Akt et GSK3- β , conduire à l'arrêt des cellules en phase G1 et entraîner une diminution du taux de prolifération des cellules C2C12 (Fig. 25 et 26 ; Yang et al., 2007). Enfin, il a été montré que MyoD pouvait être réprimé au cours de la phase G1 par la cycline cdk2 (Tintignac et al., 2000).

Dans un milieu de différenciation, la myostatine est capable de réguler négativement l'expression de Pax3 mais aussi de facteurs myogéniques tels que MyoD, Myf5 et la myogénine (Fig. 26 ; Amthor et al., 2002; Joulia et al., 2003; Langley et al., 2002; McFarlane et al., 2006; Ríos et al., 2002). Les études ont montré que SMAD3 phosphorylé est capable de se fixer directement au domaine b-HLH de MyoD afin d'en inhiber l'activité (Langley et al., 2002; Liu et al., 2001). De plus, des billes recouvertes de myostatine implantées au cours du développement chez le poulet, à un stade où Pax3, Myf5 et MyoD sont exprimés, entraîne une diminution de l'expression de ces protéines mais aussi de la desmine de façon indirecte, ce qui montre une perturbation du développement musculaire par voie de conséquence (Amthor et al., 2002). Chez les animaux bovins hypermusclés, déficients en myostatine protéique fonctionnelle, il a été montré une augmentation du taux de transcrits de MyoD qui entrainerait une augmentation de la différenciation des fibres musculaires et participerait à l'apparition du phénotype hypermusclé observé (Oldham et al., 2001).

En conclusion, la myostatine agit de façon autocrine et paracrine pour réguler à la fois la prolifération cellulaire et la survie des myocytes en différenciation, en modulant l'expression de protéines du cycle cellulaire et de l'apoptose, mais aussi en jouant un rôle inhibiteur sur l'expression de facteurs myogéniques. Ainsi, le phénotype d'hypertrophie et d'hyperplasie observé à la naissance chez les animaux déficients pour la myostatine serait dû à une augmentation de la prolifération des myoblastes et de la différenciation terminale des myocytes en myotubes.

Rôle post-natal

Au cours de la croissance musculaire après la naissance ou en cas de lésion musculaire, les cellules satellites normalement à l'état quiescent, entrent dans le cycle cellulaire et prolifèrent afin de produire des cellules satellites qui resteront à l'état quiescent et des cellules progénitrices de myoblastes qui proliféreront à leur tour et se différencieront pour fusionner avec les fibres musculaires préexistantes. La myostatine est exprimée après la naissance dans les cellules satellites et les myoblastes qui dérivent de ces cellules satellites (McCroskery et al., 2003). Une étude comparative de la présence et des effets potentiels en post-natal de la myostatine *in vivo* entre des souris déficientes pour le gène *myostatine* avec un phénotype d'hypertrophie musculaire (McPherron et al., 1997) et des souris normales a permis d'observer un effet négatif de la régulation de la myostatine dans les cellules satellites sur la croissance des fibres

musculaires (McCroskery et al., 2003). La myostatine contrôlerait la quiescence des cellules satellites en bloquant leur activation et leur auto-renouvellement et en maintenant le cycle cellulaire au stade G0 (Fig. 26 ; McCroskery et al., 2003). De plus, la myostatine aurait un rôle dans la migration des cellules myoblastiques néo-produites après inflammation vers le lieu de la lésion musculaire (McCroskery et al., 2005). En outre, des souris irradiées par des rayons γ dans le but d'éliminer la capacité proliférative des cellules satellites, voient leur masse musculaire augmenter de 20% après surexpression de la follistatine (un inhibiteur de la myostatine) alors que les souris non irradiées présentent une augmentation de leur masse musculaire de 37% (Gilson et al., 2009). Une augmentation du nombre de noyaux musculaires est également observée ce qui corrèle avec une activation des cellules satellites (Gilson et al., 2009). Une augmentation de l'expression de MHCIIb, un marqueur de la myogenèse est aussi observée ce qui corrèle avec une augmentation de la synthèse protéique (Gilson et al., 2009). Cette étude montre donc l'implication de l'activation des cellules satellites ainsi qu'une augmentation de la synthèse protéique dans l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire en cas de déficience dans la voie de signalisation de la myostatine. Cependant, d'autres études contredisent ces données en stipulant que l'absence ou la présence de la myostatine dans les cellules satellites n'a pas d'influence sur leur prolifération *in vitro* (Amthor et al., 2009; Lee et al., 2012; Wang and McPherron, 2012). L'injection d'un propeptide recombinant de la myostatine dans du muscle *tibialis anterior* de souris C57Bl6 âgées de deux mois entraîne une nette augmentation de la masse musculaire de 15% après 14 jours et 28% après 28 jours comparée aux souris contrôles (Amthor et al., 2009). Les analyses morphométriques montrent une augmentation du diamètre des fibres de 12% après 1 mois et de 16% après 2 mois sans modification du nombre de fibres ni du nombre de cellules satellites par myofibre (Amthor et al., 2009). L'injection *in vivo* d'un récepteur soluble non fonctionnel de la myostatine, qui bloque sa voie de signalisation, dans des souris C57BL/6NCr âgées de 6 semaines, entraîne l'apparition d'un phénotype d'hypertrophie musculaire avec peu ou pas d'activation de cellule satellite (Wang and McPherron, 2012). Enfin, l'inhibition de la myostatine et de l'activine A dans des souris déficientes pour les gènes *syndecan4* ou *Pax7*, protéines essentielles dans la fonction des cellules satellites, entraîne malgré cela un phénotype d'hypertrophie musculaire (Lee et al., 2012).

Ces études montrent que l'absence de myostatine peut permettre l'activation de cellules satellites, mais que le taux de cellules satellites activées est bas et ne semble pas être impliqué dans l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire. L'augmentation du diamètre des

fibres musculaires semblent due à une augmentation de la synthèse protéique en l'absence de myostatine plutôt qu'à une activation des cellules satellites. Des études supplémentaires sont requises afin de réellement comprendre le rôle de la myostatine dans la croissance musculaire adulte, par l'inhibition de la synthèse protéique et/ou le blocage des cellules satellites dans un état quiescent. La compréhension de ce mécanisme est extrêmement importante dans la recherche de traitement contre les dystrophies et les myopathies dégénératives.

Il est donc indéniable que la myostatine tient un rôle majeur dans le développement du muscle squelettique en modulant l'avenir des myoblastes, des myocytes en différenciation en développement prénatal et des fibres musculaires après la naissance. Néanmoins, il semble que d'autres types cellulaires soient capables de réagir sous les effets de la myostatine, c'est le cas du tissu adipeux.

b) Dans le tissu adipeux

Les premières expériences de détection du profil d'expression avaient également pu mettre en évidence la myostatine dans le tissu adipeux (McPherron et al., 1997). A partir de 6 mois, les souris *mstn*^{-/-} cessent de gagner du poids ce qui signifie qu'à 9-10 mois, les souris *mstn*^{-/-} et *mstn*^{+/+} sont de poids équivalents. Les analyses montrent que les masses comparables des souris à l'âge adulte ne sont pas dues à une normalisation de la masse musculaire avec l'âge des souris *mstn*^{-/-} mais à une accumulation de graisse avec l'âge des souris *mstn*^{+/+} (McPherron and Lee, 2002). Chez les souris *mstn*^{-/-}, la masse graisseuse est inférieure à 70% par rapport à celle des souris *mstn*^{+/+}, et la masse de tissu adipeux brun est inférieure de 50%. Cette diminution de masse graisseuse est à la fois due à une hypoplasie et à une hypotrophie du tissu adipeux avec une diminution de 25% du nombre de cellule et une diminution de 40% de la masse cellulaire au niveau du tissu gonadique par exemple (McPherron and Lee, 2002). En outre, les souris *mstn*^{-/-} présentent une diminution significative de la quantité de triglycérides et du taux de cholestérol par rapport aux souris *mstn*^{+/+}. Le rôle de la myostatine au niveau du tissu adipeux dans la prévention de l'obésité est clairement démontré chez des souris *mstn*^{-/-} présentant également la mutation *agouti* rendant les souris obèses, où la perte de fonction du gène *myostatine* supprime partiellement le développement de l'obésité. En effet, les souris *mstn*^{-/-} avec la mutation *agouti* ont un phénotype plus similaire aux souris *mstn*^{-/-} sans la mutation *agouti*, qu'aux souris *mstn*^{+/+} avec la mutation *agouti*. L'absence de myostatine compenserait les effets de la mutation

agouti au niveau du développement de l'obésité et limiterait l'apparition du diabète (McPherron and Lee, 2002).

La myostatine a donc un effet aussi sur l'adipogenèse. Des analyses *in vitro* ont pu démontrer le rôle de la myostatine sur la différenciation de cellules préadipocytaires (Kim et al., 2001). La différenciation des adipocytes est contrôlée principalement par deux familles de facteurs de transcription : les CCAAT/*enhancer binding proteins* (C/EBP) et les *peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs). Parmi eux, PPAR- γ et C/EBP- α sont deux facteurs importants qui induisent l'arrêt de la croissance au cours de la différenciation préadipocytaire et modulent l'expression de gènes jouant un rôle dans la différenciation adipocytaire. La différenciation adipocytaire est aussi modulée par d'autres membres de la famille des TGF- β comme BMP2 et BMP7. L'ajout des facteurs adipogéniques C/EBP- α et PPAR- γ dans des cellules préadipocytaire (lignée 3T3-L1) entraîne une augmentation de l'activité du promoteur du gène *myostatine* (Allen et al., 2008). À l'inverse, l'ajout de myostatine dans le milieu de différenciation de cellules préadipocytaires entraîne une diminution de l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH, un marqueur de la différenciation tardive des adipocytes), de la coloration *Oil Red-O staining* (marque les gouttelettes lipidiques), du taux d'expression de C/EBP- α , de PPAR- γ , de BMP7 et de la leptine, une hormone sécrétée par les adipocytes (Kim et al., 2001; Lin et al., 2002; Rebbapragada et al., 2003). La myostatine pourrait donc inhiber la différenciation des cellules du tissu adipeux en agissant sur l'expression de C/EBP- α , PPAR- γ et BMP7 (Kim et al., 2001; Lin et al., 2002; Rebbapragada et al., 2003).

5. Thérapie génique par inhibition de la myostatine

L'augmentation de la croissance musculaire par l'inhibition de la myostatine laisse imaginer la possibilité de traitements dans le domaine biomédical afin de remédier à certaines pathologies myopathiques, mais permettrait aussi à un plus large public fanatique du culturisme, ou sportifs, d'améliorer ses capacités musculaires. Enfin, dans le domaine de la production de viandes chez les animaux de rentes, un traitement permettrait de contrôler la quantité et la qualité de la viande.

a) Traitement des myopathies

L'une des caractéristiques de la myostatine est d'être circulante dans le sang (Gonzalez-Cadavid et al., 1998). Cette propriété a suggéré aux chercheurs l'utilisation de traitements systémiques ciblant la myostatine pour soigner les myopathies dégénératives comme la cachexie, la sarcopénie ou des dystrophies musculaires comme la dystrophie musculaire de Duchenne. Plusieurs stratégies ont été mises en place afin de bloquer les effets de la myostatine dans le muscle, par injection d'inhibiteurs de la myostatine comme son propeptide, la follistatine, le récepteur de la myostatine dans un état soluble non fonctionnel ou d'anticorps anti-myostatine.

L'administration chez des souris âgées de 2 à 4 semaines, sauvages pour la *myostatine*, d'un anticorps monoclonal anti-myostatine capable de se lier à la myostatine et de bloquer son signal, conduit à une augmentation de la masse musculaire (par hypertrophie et non par hyperplasie) de ces souris ainsi que de leur force d'agrippement sans effet négatif apparent sur l'histologie du muscle (mis à part l'augmentation du diamètre des fibres), ni sur la taille et l'histologie des autres organes (Whittemore et al., 2003). Une augmentation de la masse musculaire et du diamètre des fibres est également observée après injection d'un récepteur soluble non fonctionnel de la myostatine dans des souris âgées de 6 semaines, sauvages pour la myostatine (Wang and McPherron, 2012), ainsi qu'après injection d'un propeptide recombinant de la myostatine (Amthor et al., 2009; Hu et al., 2010; Li et al., 2010; Matsakas et al., 2009).

Dystrophies musculaires

L'administration d'inhibiteurs de l'activité de la myostatine pourrait donc faire office de traitement pour soigner des myopathies. Ainsi, les bénéfices d'un blocage de l'activité de la myostatine sur le tissu musculaire en dégénérescence ont été testés en utilisant pour modèle les souris *mdx* (Amthor et al., 2009; Bogdanovich et al., 2002; Wagner et al., 2002). Les souris *mdx* sont des orthologues génétiques des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker largement utilisées comme modèle d'étude des mécanismes moléculaires associés. Ces souris présentent une mutation nonsense dans le gène de la dystrophine qui conduit à la production d'une protéine tronquée incapable d'assurer sa fonction (Sicinski et al., 1989).

D'une part, des souris *mdx* ont été croisées avec des souris *mstn*^{-/-} dans le but d'obtenir des lignées *mstn*^{-/-}/*mdx* et *mstn*^{+/-}/*mdx*. Ces souris sont plus larges et plus musclées que les souris *mstn*^{+/-}/*mdx*. En effet, elles présentent une masse corporelle et une masse musculaire supérieure

aux trois stades étudiés : 3, 6 et 9 mois ainsi qu'un diamètre de fibres supérieur (Amthor et al., 2009; Wagner et al., 2002). En outre, elles ont plus de force et une longévité supérieure. Enfin, le remplacement progressif des fibres musculaires par du tissu fibreux et par du tissu adipeux habituellement observé pour ces dystrophies est amoindri en l'absence du gène *myostatine* (Wagner et al., 2002). Ces croisements ont donc montré que la déficience en myostatine chez des souris *mdx* atténue le phénotype de dystrophie musculaire. De plus, des souris transgéniques pour un inhibiteur de la myostatine semblable à la follistatine, croisées avec des souris *mdx*, ont pour descendance des souris plus larges et avec plus de force musculaire (Nakatani et al., 2008).

D'autre part, des souris *mdx* âgées de 6 semaines, traitées par du récepteur soluble non fonctionnel de la myostatine présentent, à l'âge de 5 mois, un poids et une force musculaire significativement plus élevés ainsi qu'une diminution du taux de créatine kinase par rapport aux souris non traitées (Morine et al., 2010). D'autre part, des souris *mdx* âgées de 4 semaines traitées par injection intra-péritonéale d'anticorps anti-myostatine, présentent également, à l'âge de 3 mois, un poids significativement plus élevé que les souris non traitées, une masse musculaire supérieure (là encore par hypertrophie plutôt que par hyperplasie), un meilleur rendement calorifique, un meilleur maintien, une diminution de la dégénérescence musculaire et un rétablissement quasi à la normale du taux sanguin de créatine kinase (Bogdanovich et al., 2002).

Le traitement par un anticorps anti-myostatine a même déjà été porté jusqu'à l'essai clinique (Wagner et al., 2008). Une centaine de patients atteints des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker, de la dystrophie facioscapulo-humérale, ou de la dystrophie musculaire des ceintures ont été traités avec des doses plus ou moins fortes de MYO-029, un anticorps monoclonal humain qui se lie à la myostatine et en inhibe son activité. Après injection de MYO-029, seule une hypersensibilité de la peau a pu être observée comme effet secondaire et seulement à partir d'une très haute dose de MYO-029. Cependant, aucune amélioration de la fonction ni de la force musculaire n'a pu être observée (Wagner et al., 2008).

L'inhibition de la myostatine peut également s'effectuer par la manipulation de ses pré-ARNm et de leur maturation par épissage alternatif. L'équipe de George Dickson a utilisé des oligonucléotides antisens afin de réaliser un « saut d'exon » (*exon skipping*) lors de l'épissage des transcrits du gène *myostatine* afin de ne pas insérer l'exon 2 dans le transcrit mature (Kang et al., 2011; Malerba et al., 2012). Le saut d'exon est concluant à la fois *in vitro* et *in vivo* puisqu'il

conduit à une diminution du taux de myostatine mais aussi à une augmentation de la prolifération des cellules C2C12 et une augmentation de la masse de certains muscles (*soleus*, *tibialis anterior*) chez les souris injectées par ces oligonucléotides (Kang et al., 2011; Malerba et al., 2012). Cette technique a également été testée pour réaliser un saut d'exon dans le gène *dystrophine* (Malerba et al., 2012). L'utilisation d'oligonucléotides antisens pour le saut d'exon peut devenir une stratégie thérapeutique afin de remédier à la perte musculaire associée à la dystrophie musculaire puisque des souris traitées avec les oligomères capables d'entraîner à la fois un saut d'exon des gènes *myostatine* et *dystrophine*, présentent une augmentation de la masse musculaire (Malerba et al., 2012). Cette stratégie thérapeutique ne présenterait pas de risque d'une insertion non contrôlée d'un patrimoine génétique étranger dans le génome comme lors de l'utilisation d'adénovirus. De plus, cette stratégie peut être contrôlée par un dosage précis d'injection des oligomères qui peut être interrompus à tout moment. Enfin, aucun risque toxique n'a été rapporté jusqu'à présent ainsi qu'aucune réponse immunitaire liée à l'injection de ces oligomères (Malerba et al., 2012).

Une autre stratégie d'immunisation afin d'exprimer des anticorps anti-myostatine a été développée par une équipe chinoise (Zhang et al., 2011, 2012b). L'administration orale de levures *Saccharomyces cerevisiae* exprimant la myostatine recombinante entraîne la production d'anticorps anti-myostatine chez les souris traitées. Bien que la réponse immunitaire soit plus importante après injection de la myostatine recombinante que par administration orale, il est tout de même observé une augmentation de la masse corporelle associée à une augmentation de la masse des muscles étudiés au bout de 7 semaines de traitement, de façon significative, sans modification des autres organes et sans effets toxiques (Zhang et al., 2011, 2012b).

Sarcopénie

Par ailleurs, d'autres analyses ont été réalisées sur des souris âgées afin de voir si l'absence de myostatine n'aurait pas des effets négatifs à long-terme. Des souris âgées de 24 mois, déficientes pour le gène *myostatine*, présentent une masse musculaire deux fois supérieure à la masse musculaire des souris contrôles avec aucun signe de myopathie (Wagner et al., 2005). Après lésion musculaire, ces souris âgées ont toujours la capacité de régénération musculaire et guérissent même plus vite que les souris sauvages (Wagner et al., 2005). Ces analyses montrent donc qu'il n'y a pas d'effet délétère de l'absence de myostatine au cours du vieillissement ce qui est un point important dans le traitement de dystrophies musculaires à long terme mais aussi dans

le traitement de la sarcopénie. Ainsi, des souris âgées de 18 mois de lignée C57BL/6 sauvages pour la myostatine ont été traitées avec des anticorps anti-myostatine. L'administration de ces anticorps chez ces souris limite la perte de masse corporelle et musculaire normalement observée avec le vieillissement (Murphy et al., 2010). De plus, l'injection d'anticorps anti-myostatine chez ces souris âgées entraîne une augmentation du diamètre des fibres musculaires et une diminution du taux d'apoptose (Murphy et al., 2010). Néanmoins, une autre étude stipule que des souris âgées de 24 mois, déficientes pour le gène *myostatine* dès la naissance ne sont pas résistantes à la sarcopénie, elles perdent de la masse musculaire de façon autant proportionnelle que les souris sauvages du même âge (Wang and McPherron, 2012).

Cachexie

L'inhibition de la myostatine dans le traitement de la cachexie, un syndrome de dégénérescence musculaire présent dans la moitié des cancers, a été testée. Des souris déficientes pour le gène *myostatine*, dans lesquelles ont été injectées des cellules malignes, présentent une perte musculaire proportionnellement plus élevée que les souris sauvages. L'absence de myostatine chez les souris déficientes ne les protège pas de la perte musculaire induite par la cachexie cancéreuse (Benny Klimek et al., 2010). De plus, même la surexpression de la follistatine par traitement à la Trichostatine A, qui entraîne l'apparition d'un phénotype hypermusclé chez des souris sauvages, ne permet pas d'empêcher la perte musculaire de souris cachexiques (Benny Klimek et al., 2010). En revanche, l'injection du récepteur soluble non fonctionnel de la myostatine dans des souris cachexiques inhibe la perte musculaire (Benny Klimek et al., 2010).

La forte homologie du gène *myostatine* murine avec le gène *myostatine* humain (McPherron et al., 1997), l'exceptionnel phénotype musculaire observé chez un patient humain avec une perte de fonction totale du gène *myostatine* (Schuelke et al., 2004), ainsi que l'implication de dysfonctions de la myostatine dans bons nombres de myopathies humaines sont les arguments qui mettent en avant l'idée que de tels traitements, adaptés à l'homme, pourraient permettre l'amélioration de la vie de patients souffrant de myopathies dégénérantes telles que les dystrophies, la sarcopénie, la cachexie, les myopathies liées à des infections chroniques ou celles liés à une immobilisation prolongée.

b) Suppléments alimentaires

Des laboratoires pharmaceutiques mettent déjà en vente des suppléments alimentaires, commercialisables à un large public et promettant une augmentation de la croissance musculaire. Ces suppléments alimentaires sont composés de polysaccharides sulfatés issus de la plante marine *Cystoseira canariensis*, qui se lierait à des cytokines comme la myostatine afin de réguler directement leur activité biologique (Ramazanov et al., 2003). Cependant, les analyses qui ont testé l'efficacité de ces suppléments alimentaires ne concluent pas sur une différence significative de la masse corporelle, de la masse grasse, de la force musculaire et du taux de myostatine dans le sérum avec ou sans prise de ces suppléments alimentaires (Willoughby, 2004).

c) Amélioration de la qualité de la viande

L'inhibition de la signalisation de la myostatine présente un intérêt économique dans le domaine de la production de viande animale. Depuis des siècles, les éleveurs sélectionnent les animaux qui présentent une viande de meilleure qualité, plus gouteuse et peu grasse et avec un bon rendement viande/carcasse. Cette sélection se fait aujourd'hui par l'observation de certains caractères phénotypiques mais aussi par des tests génétiques. L'injection d'une myostatine recombinante chez le cochon entraîne la production d'anticorps anti-myostatine et une diminution du taux de transcrits du gène *myostatine* (Long et al., 2009). Les analyses montrent que ces cochons immunisés contre la myostatine présentent un meilleur rendement viande/carcasse, un taux moindre de graisse intramusculaire et une diminution de la créatine kinase (Long et al., 2009). L'obtention contrôlée d'animaux avec un phénotype musculaire plus large et avec un taux de masse grasse également contrôlée serait un avantage indéniable dans la production de viande. Cependant, très peu d'études ont été réalisées jusqu'à présent.

Néanmoins, la sélection d'animaux de races d'espèces bovines et ovines entre autres, qui présentent un phénotype hypermusclé avec un taux moindre de masse grasse s'effectue depuis des siècles et l'association de la majorité de ces phénotypes hypermusclés avec des mutations dans le gène *myostatine* est aujourd'hui bien établi.

6. La myostatine et le locus *mh* associés au phénotype d'hypertrophie musculaire

Les fonctions potentielles de la myostatine au niveau du muscle squelettique principalement, mais aussi au niveau du tissu adipeux, du cœur et de la glande mammaire exposées précédemment pourraient expliquer les caractéristiques physiopathologiques observées chez les bovins avec un phénotype d'hypertrophie musculaire.

C'est pourquoi, les chercheurs du monde entier ont par la suite voulu savoir si le gène *myostatine* était impliqué dans l'apparition de ce phénotype musculaire atypique.

Depuis les années 80, chez le bovin, l'objectif était de localiser le locus chromosomique à l'origine de l'hypertrophie musculaire, appelé locus *mh*. Après la découverte réalisée par l'équipe de McPherron en 1997 (McPherron et al., 1997), les scientifiques ont pu associer le locus *mh* prédit avec le gène *myostatine*. Ainsi, bon nombre de phénotypes hypermusclés ont ainsi pu trouver pour origine une mutation du gène *myostatine* (Grobet et al., 1997, 1998; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997). Voici une liste des mutations du gène *myostatine* déjà répertoriées chez plusieurs races bovines.

Nt821(del11)

Il s'agit d'une délétion de 11-pb entre les nucléotides 821 et 831 (en partant du codon d'initiation). Cette délétion qui s'est produite après la première cystéine du domaine C-terminal (après le 7^{ème} acide aminé suivant le clivage protéolytique menant à une délétion de 102 acides aminés) modifie la séquence peptidique en aval et fait apparaître un codon STOP prématuré 14 codons après la délétion (codon 287) (Grobet et al., 1997; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997). La protéine qui en résulte est donc tronquée de toute sa partie bioactive. Cette délétion est présente en majorité chez la race Blanc Bleu Belge, mais elle a aussi pu être observée pour quelques animaux de la race Asturienne, Parthenaise, Rubia Gallega, Limousine et Blonde d'Aquitaine (Grobet et al., 1997). Un cas sporadique a aussi été retrouvé chez un animal de race Angus rouge non hypermusclée (McPherron and Lee, 1997) ce qui montre que ces analyses faites sur un nombre très peu important d'animaux (2 à 8 animaux par race) ne peuvent pas être considérées comme une généralité pour toutes ces races (excepté pour la race Blanc Bleu Belge), notamment pour les races Limousine et Blonde d'Aquitaine.

C313Y

La mutation C313Y provient d'une substitution G→A dans l'exon 3 au niveau du triplet qui code pour la 5^{ème} cystéine de la partie C-terminale bioactive de la myostatine (Fig. 19). La cystéine normalement présente est remplacée par une Tyrosine, ce qui empêche possiblement la formation de la structure intramoléculaire de la myostatine associée à la cystéine originelle et entraîne la perte de fonction de la protéine. Cette mutation est retrouvée chez la race Piémontaise et la Gasconne (Grobet et al., 1998; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997).

Nt419(del7-ins10)

Cette mutation est une délétion de 7 nucléotides associée à l'insertion de 10 autres nucléotides en position 419. Cette délétion/insertion entraîne l'apparition d'un codon STOP prématuré dans le propeptide à l'acide aminé 140 et la perte de fonction de la protéine. Nt419(del7-ins10) a été observée en race Maine-Anjou (Grobet et al., 1998).

Q204X

La mutation Q204X provient d'une substitution C→ T dans le second exon du gène *myostatine* qui entraîne la substitution d'une glutamine par un codon STOP et la perte de fonction de la protéine. Cette mutation est présente en race Charolaise (Grobet et al., 1998).

E226X

La mutation E226X provient d'une substitution G→ T dans le second exon du gène *myostatine* qui entraîne la substitution d'un glutamate par un codon STOP et la perte de fonction de la protéine. Cette mutation est présente en race Maine-Anjou (Grobet et al., 1998).

D'autres polymorphismes du gène *myostatine* ont pu être mis en évidence mais leurs implications dans l'apparition du phénotype d'hypertrophie musculaire reste à démontrer.

F94L

La mutation F94L provient d'une substitution C→A dans le premier exon du gène *myostatine* et se traduit au niveau de la séquence peptidique par la substitution d'une phénylalanine par une leucine. Cette substitution a été observé en race Limousine (Grobet et al., 1998) mais également chez des animaux non hypermusclé. De plus, chez la souris, on observe

une tyrosine à cet emplacement ce qui suggère que cette substitution n'entraîne pas une perte de fonction de la protéine et est donc possiblement silencieuse.

Nt414(C-T)

Nt414(C-T) est une substitution C→T au niveau du 3^{ème} nucléotide du 138^{ème} codon qui est une cystéine. Il s'agit d'une mutation silencieuse qui n'entraîne pas de changement d'acides aminés. Cette substitution est observée en race Charolaise, Maine-Anjou et Limousine de façon répandue. Elle est également présente chez d'autres races comme la Prim'Holstein mais à une plus faible fréquence (Grobet et al., 1998; Smith et al., 2000).

E291X

E291X provient d'une substitution G→T en position 871 à partir du codon d'initiation de la traduction. Elle se traduit par la substitution d'un acide glutamique par un codon STOP, ce qui bloque la traduction après la 254^{ème} base dans le 3^{ème} exon. Cette mutation a été observée en race Marchigiana (Karim et al., 2000; Marchitelli et al., 2003; Smith et al., 2000).

D'autres polymorphismes du gène *myostatine* ont pu être mis en évidence mais leur localisation intronique ne permet pas de conclure à un effet sur la fonction de la myostatine : Nt374-51(T-C), nt374-50(G-A), nt374-16(del1) : intron 1 et Nt748-78(del1) : intron 2 (Grobet et al., 1998).

Comme l'avait supposé Wriedt dans les années 30, le phénotype d'hypertrophie musculaire n'est donc pas dû uniquement à une seule mutation dans un gène donné. Les études sur le gène *myostatine* ont ainsi pu démontrer un certain nombre de mutations dans ce gène selon les espèces et selon les races, entres autres des mutations perte de fonction. Ces résultats sont donc contradictoires avec l'hypothèse de Mennissier dans les années 80, qui au contraire, pensait que le phénotype hypermusclé était apparu en premier dans la race Shorthorn bovine et s'était étendue après avoir migrée des îles britanniques vers le continent et le reste du monde.

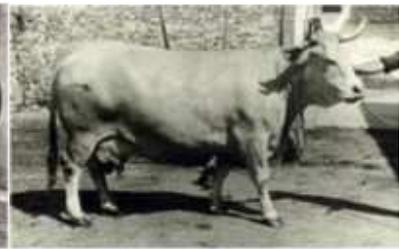
Néanmoins, certaines races bovines de phénotype hypermusclé, qui ont été sélectionnées depuis des siècles par les éleveurs pour leur conformation et la qualité de leur viande, ne présentent pas à ce jour de mutation dans le gène *myostatine* qui soit significativement liée à l'apparition de ce phénotype. C'est le cas notamment de la race Limousine et c'était également le cas de la race Blonde d'Aquitaine jusqu'à notre étude récente mettant en évidence une mutation



La Garonnaise



La Quercy



La Pyrénéenne

Figure 27 : Photos d'animaux de race Garonnaise, Quercy et Pyrénéenne.

dans le gène *myostatine* associée à l'apparition du phénotype hypermusclé dans cette race (Bouyer et al., 2014).

III. La race Blonde d'Aquitaine

1. Historique de la race

La race Blonde d'Aquitaine a réellement été établie en tant que telle en 1962 après le rassemblement de trois rameaux de races bovines aux muqueuses claires du sud ouest. Ces trois rameaux regroupent la Garonnaise, la Quercy et la Blonde des Pyrénées dont l'ancêtre commun serait *Bos Aquitanicus* (Fig. 27). L'unification de ces trois races a été réalisée suite à la demande de la commission de modernisation de la production animale du commissariat général dans les années 40 qui voulait réduire le nombre de races ayant un petit effectif, dans le but d'optimiser l'efficacité des programmes d'amélioration génétique. La race Limousine devait au départ également faire partie de cette nouvelle race de Blonde du sud-ouest, mais elle bénéficiait d'une bonne image de marque, ce qui lui a permis d'être préservée.

La race Blonde d'Aquitaine a ensuite vu ses effectifs largement augmentés entre les années 70 et les années 2000 non seulement en région Aquitaine et Midi-Pyrénées mais aussi ailleurs. Ainsi, en 1970, l'effectif des animaux de race Blonde d'Aquitaine passe de 106 200 en région Aquitaine, 43 600 en région Midi-Pyrénées et 0 animaux en dehors de ces régions à des effectifs de 179 661 en région Aquitaine, 149 871 en région Midi-Pyrénées et 153 944 en dehors de ces régions en 2000. De plus, les études ont montré qu'en 2002 le nombre d'élevage de la race Blonde d'Aquitaine était supérieur hors berceau Aquitain (46%) par rapport à la région Aquitaine (28%) et la région Midi-Pyrénées (26%). Ainsi, la Blonde d'Aquitaine est exportée à travers le monde, dans divers pays européens, dans les DOM-TOM, en Amérique du Nord et du Sud, en Australie et en Nouvelle Zélande. En 2007, l'effectif de la race Blonde d'Aquitaine en France s'élevait à 521 425 animaux tandis que l'effectif mondial s'élevait déjà à 2 millions d'animaux.

Tableau 2 : Valorisation économique des animaux de race Blonde d'Aquitaine par rapport à la moyenne des animaux de l'ensemble des autres races (données France Agrimer).

BROUTARD MALE	Poids vif	Prix	Prix au kg vif
Ensemble des races françaises	338 kg	847 €	2,51 €
Blonde d'Aquitaine	260 kg	900 €	3,46 €

BROUTARD FEMELLE	Poids vif	Prix	Prix au kg vif
Ensemble des races françaises	297 kg	723 €	2,43 €
Blonde d'Aquitaine	260 kg	819 €	3,15 €

JEUNE BOVIN MALE	Poids vif	Prix	Prix au kg vif
Ensemble des races françaises	422 kg	1 320 €	3,13 €
Blonde d'Aquitaine	418 kg	1 496 €	3,58 €

GENISSE DE BOUCHERIE	Poids vif	Prix	Prix au kg vif
Ensemble des races françaises	384 kg	1 424 €	3,71 €
Blonde d'Aquitaine	453 kg	1 898 €	4,19 €

VACHE DE REFORME	Poids vif	Prix	Prix au kg vif
Ensemble des races françaises	433 kg	1 513 €	3,49 €
Blonde d'Aquitaine	486 kg	2 040 €	4,21 €

2. Caractéristiques morphologiques et potentiel économique

La race Blonde d'Aquitaine est devenue une race très prisée pour la qualité de sa viande et ses facilités de vêlage. Elle est la troisième race à viande en France derrière les races Limousine et Charolaise. Elle se caractérise par une forte musculature avec un avant et un arrière train très musclés. Les animaux de la race Blonde d'Aquitaine ont un corps très long et équilibré avec une ossature plutôt fine et un dos large, horizontal, bien musclé et épais ce qui permet de larges proportions des muscles donnant des viandes nobles. Le rendement à l'abatage peut s'élever jusqu'à 65 à 70% avec 75% à 80% de viande nette par rapport à la carcasse.

Les animaux de la race Blonde d'Aquitaine sont très valorisables économiquement parlant (Tableau 2). En effet, un adulte mâle se vend 3,46€/kg contre 2,51€/kg pour une autre race française en moyenne. Un veau de race Blonde d'Aquitaine se vend 3,58€/kg contre 3,13€/kg et une génisse de boucherie se vend 4,19€/kg contre 3,71€/kg pour une autre race française en moyenne.

Cette race présente également de meilleures qualités maternelles avec des mamelles bien développées. Son bassin long et large lui permet, outre une excellente qualité de viande, de lui assurer une facilité de vêlage dans 95% des cas.

Sa largeur de poitrine est plus importante que chez d'autres races hypermusclées ce qui lui assure une meilleure fonction respiratoire.

La race Blonde d'Aquitaine a de bonnes capacités de thermorégulation puisqu'on retrouve des troupeaux au Canada ou en République tchèque où les températures peuvent descendre jusqu'à -20°C mais aussi dans les endroits chauds pouvant atteindre 40°C.

Le muscle squelettique des animaux de race Blonde d'Aquitaine présente une proportion plus importante de fibres glycolytiques de type II et une plus faible teneur en collagène par rapport à ce qui est observé chez les animaux hypermusclés d'autres races. De plus, la teneur en lipides intramusculaires est également moindre chez les animaux de race Blonde d'Aquitaine par rapport aux animaux hypermusclés d'autres races en moyenne. Ces caractéristiques dénotent d'une viande plus tendre et moins grasse donc avec une moindre saveur (Listrat et al., 2001).

Projet de recherche

Variabilité phénotypique du développement musculaire chez la race bovine Blonde d'Aquitaine : étude fine de la régulation du gène *myostatine*.

L'un des objectifs de la sélection bovine en race Blonde d'Aquitaine est de sélectionner des animaux qui produiront une viande plus tendre et avec une meilleure saveur. La mise en évidence du gène associé à l'apparition du phénotype hypermusclé en race Blonde d'Aquitaine permettrait de comprendre les mécanismes associés et d'établir des tests génétiques de sélection pouvant faciliter la production de viande de façon quantitative et qualitative. La mise en place de tests génétiques rapides permettrait d'identifier les animaux à sélectionner de façon précoce. Ces tests génétiques seraient donc un gain de temps et d'argent puisqu'ils éviteraient l'élevage d'animaux produisant une viande potentiellement moins rentable économiquement.

Les caractéristiques morphologiques observées en race Blonde d'Aquitaine, ainsi que la composition du muscle en une plus forte proportion de fibre musculaire glycolytique, avec une teneur plus faible en collagène et en quantité lipidique intramusculaire, sont des caractéristiques similaires associées au phénotype d'hypertrophie musculaire observé chez d'autres races hypermusclées pour lesquelles l'origine génétique est aujourd'hui bien établie et due à des mutations perte de fonction dans le gène *myostatine*. Les études se sont orientées vers l'examen de l'implication de ce gène dans le contrôle de ce phénotype hypermusclé en race Blonde d'Aquitaine. Néanmoins, aucune mutation de la séquence codante du gène *myostatine* n'a pu être mise en évidence. Chez les animaux de race Blonde d'Aquitaine il n'y avait ni réduction de la concentration en transcrite du gène *myostatine* ni altération de la séquence en acides aminés (Karim et al., 2000). Par ailleurs, contrairement à la race Blanc Bleu Belge dont la majorité des animaux présentent un phénotype hypermusclé extrême, les animaux de race Blonde d'Aquitaine sont de phénotype extrêmement variable. Au cours de ma thèse, nous avons cherché à i) mettre en évidence l'origine génétique de l'apparition du phénotype hypermusclé chez les animaux de race Blonde d'Aquitaine et à ii) comprendre l'origine

génétique de la variabilité du phénotype observée entre les animaux de la race Blonde d'Aquitaine.

Lors de ce travail, nous avons réussi à mettre en évidence la mutation du gène *myostatine* à l'origine du phénotype d'hypertrophie musculaire qui caractérise la race bovine Blonde d'Aquitaine. Ce travail a donné lieu à un article dans un journal à comité de lecture (Bouyer et al., 2014). À la suite de cette découverte, nous avons entrepris d'élucider les mécanismes moléculaires qui régissent la variabilité phénotypique du développement musculaire entre les animaux de cette même race, notamment ceux de même génotype quant à la mutation découverte. La partie résultat de ce mémoire se compose de deux parties. La première partie est relative à la démarche qui nous a conduits à découvrir ce nouvel allèle atypique du gène *myostatine* en race Blonde d'Aquitaine et la deuxième partie constitue une contribution pour élucider la variabilité phénotypique.

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

Matériel et méthodes

1. Echantillons musculaires d'animaux de race Blonde d'Aquitaine

Dix animaux de race Blonde d'Aquitaine âgés de 12 mois ont été utilisés pour cette étude. Ils ont été élevés dans la station d'élevage bovin de MIDATEST (Pyrénées Atlantique, France), ont subi les mêmes traitements et les mêmes conditions d'alimentation. Le tissu musculaire *longissimus dorsi* a été prélevé dans les 15 minutes suivant l'abatage (Abattoir de Pau, France), coupé en petit morceau puis immédiatement refroidit à l'azote liquide et transporté au laboratoire pour y être conservé à long terme à -80°C.

Les échantillons de muscle provenant d'animaux de race Limousine ont été obtenus à l'abattoir de Limoges.

2. Extractions ARN et ADN

L'ADN a été extrait à partir des dix échantillons de muscle en utilisant le kit *Qiagen QIAamp® DNA midi kit* selon les instructions du fabricant puis conservés à -20°C. L'ARN total a été extrait à partir des dix échantillons de muscle en utilisant le Tri reagent® (Sigma-Aldrich) puis traité par la DNase I (Sigma-Aldrich) en suivant les instructions du fabricant avant d'être conservé à -80°C jusqu'à son utilisation. La quantité et la qualité des ARN ont été évaluées par puce Agilent.

3. RT-PCR et RT-PCR quantitative en temps réel

La RT-PCR et la RT-PCR quantitative en temps réel ont été utilisées pour détecter les transcrits aberrants du gène *myostatine* (par RT-PCR) qui échapperaient au mécanisme de surveillance cellulaire (RT-PCR quantitative en temps réel).

2µg d'ARN total des dix animaux de race Blonde d'Aquitaine et de deux animaux de race Limousine ont été rétrotranscrits (RT) en ADNc en utilisant le kit de rétrotranscription *high-capacity cDNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems). 100ng d'ADNc (équivalent en

Tableau 3 : Amorces utilisées dans Bouyer et al., 2014.

Nom	Séquence (5'-3')	Echantillon	Objectif
Intron2-F Intron2-R	ACTGTCTTACTGTTCTTTAACAGGAG GAGAGGCACAGACTCAGAAGAAGATA	ADN génomique	RFLP-PCR (Bouyer et al., 2014 Fig. 5)
PCRWT-F PCRWT-R	ATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAG AGAAGATGGACTGACTCCTTTTTTAG	ADNc	RT-PCR transcrit sauvage (Bouyer et al., 2014 Fig. 7B)
PCRBAB-F PCRBAB-R	GTAGCATTTTAATGATCAAAGTTG TGCTGTACTCCTACAAAGTTG	ADNc	RT-PCR transcrit aberrant BAB (Bouyer et al., 2014 Fig. 7C)
Intron2seq-F Intron2seq-R	ATGTGAAGACAGTGTTCAGAACTGGCTCA TCTGTGGAGTGTTTCATCACAATCAAGCCCA	ADN génomique	PCR intron 2 en entier
5'UTR-F-2 3'UTR-R-2	AGAACAAGGGAAAAGATTGTATTGATTTTA AAATAATGGTATATAACAATACTGCA	ADNc	RT-PCR (Bouyer et al., Fig. 2)

ARN) de chaque échantillon ont été utilisés pour l'amplification par RT-PCR de la totalité de la région codante du gène *myostatine*. Les amplifications PCR ont été réalisées dans un volume final de 25µl avec 10pmol de chaque amorce (tableau 3) et 12,5µl du tampon 2X Master Mix (ABgene, Thermo Scientific), dans les conditions suivantes : Dénaturation initiale à 95°C pendant 30s, puis 35 cycles (95°C pendant 30s, 55°C pendant 30s, 72°C pendant 2min) et un cycle à 72°C pendant 5min. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés en utilisant 1µl d'ExoSAP-IT (USB® products, Affymetrix®) pour 5µl de produit de PCR et incubés 60min à 37°C et 15min à 80°C. Les produits de PCR ainsi purifiés ont été séquencés dans les deux sens en utilisant les mêmes amorces qui ont permis l'amplification. Les réactions de séquençage ont été effectuées à l'aide du kit *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®) selon les instructions du fabricant.

La RT-PCR quantitative en temps réel a été réalisée en triplicat pour chaque échantillon en utilisant 100ng d'ADNc préparés comme décrit précédemment. La quantité relative des transcrits totaux du gène *myostatine* ou seulement des transcrits aberrants a été mesurée en utilisant la sonde Taqman Bt03217979_m1 et une sonde Taqman obtenus par le service de production de sondes Taqman personnalisées (*custom design service*, Applied Biosystems), respectivement. Deux gènes, *CASC3* (*cancer susceptibility candidate 3*, de sonde Taqman : Bt0326991_m1) et *SF3A1* (*splicing factor 3a, subunit 1*, de sonde Taqman : Bt03254301_m1) ont été utilisés en tant que contrôle interne pour une normalisation plus précise des données d'expression. Les ADNc sont amplifiés en temps réel par la machine ABI PRISM®7900 (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant. Les valeurs d'expression relative ont été calculées par la méthode du $\Delta\Delta C_t$ avec la normalisation de chaque échantillon avec la moyenne de chaque C_t obtenu avec les contrôles internes.

4. Séquençage de l'intron 2 du gène *myostatine*

La séquence de 2 033pb de l'intron 2 du gène *myostatine* a été amplifiée à partir des dix échantillons d'ADN d'animaux de race Blonde d'Aquitaine en utilisant la *Taq polymérase DNApolymerase Expand Long Template* (Roche Applied Science) selon les instructions du fabricant, avec les amorces intron2seq-F et intron2seq-R (tableau 3). Les produits de PCR ont ensuite été purifiés et séquencés dans les deux sens comme décrits précédemment.

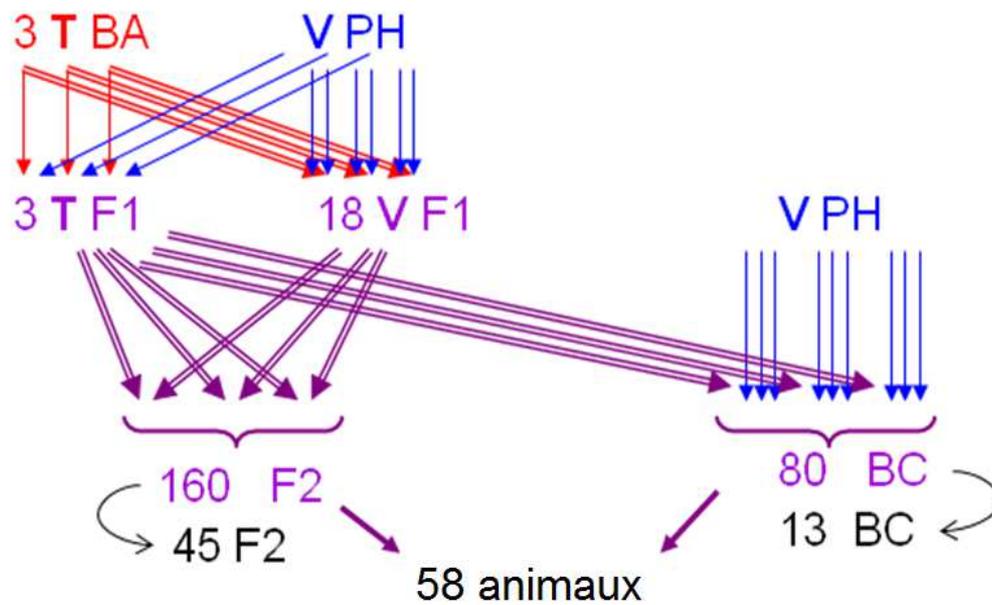


Figure 28 : Schéma de croisement pour l'obtention de 58 animaux croisés Blonde d'Aquitaine x Prim'Holstein.

Le schéma de croisements prévoyait au départ l'obtention de 160 et 80 animaux de génération F2 et Back cross (BC) respectivement. Au final, 58 animaux de génération F2 (45) et back-cross (13) ont été obtenus. TBA : taureau de race Blonde d'Aquitaine ; VPH : vache Prim'Holstein ; BC : back-cross. (Fourni par Gilles Renand).

5. Tests de RFLP-PCR

Un fragment de 763pb englobant la mutation identifiée (*T3811* → *G3811*) a été amplifié par PCR à partir de différents échantillons d'ADN génomique provenant d'animaux bovins de races françaises et internationales (445 animaux) en utilisant les amorces intron2-F et intron2-R (tableau 3). Ces produits d'amplifications ont ensuite été digérés par l'enzyme de restrictions *AflIII* (Biolabs) puis mis à migrer par électrophorèse en gel d'agarose. La mutation identifiée détruit un site de restriction d'*AflIII* qui coupe uniquement l'allèle sauvage en deux fragments de 565pb et 198pb. Une digestion par *HindIII* a été utilisée comme contrôle de coupure.

Les digestions avec *AflIII* et *HindIII* ont été effectuées en utilisant 10µl de produits de PCR non purifié, 2µl de tampon et 1µl d'enzyme dans un volume final de 20µl. 0,2µl de BSA ont été ajoutés en plus pour les digestions avec *AflIII*. La digestion est réalisée sur une nuit à 37°C.

6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont porté sur l'analyse de l'association entre le génotype (présence ou absence de l'allèle *G3811* de la race Blonde d'Aquitaine) et le phénotype (conformation de l'animal). Trois taureaux bien conformés de race Blonde d'Aquitaine, de génotype supposé *G/G*, ont été croisés avec 18 vaches de race Prim'Holstein de génotype supposé *T/T* (Fig. 28). Des mâles et des femelles de génération F1 de génotype *G/T* ont été croisés ensemble afin de produire une génération F2 (45 animaux). De plus, des mâles de génération F1 ont été croisés avec des femelles Prim'Holstein afin de produire une génération back-cross (13 animaux). Ce sont les animaux de génération F2 ou back-cross provenant de ces croisements qui sont utilisés dans cette étude.

Concernant les analyses d'association génotype/phénotype, nous disposons de 25 variables quantitatives à expliquer (variables dépendantes) mesurées sur les 58 animaux. Certaines variables sont strictement quantitatives et résultent de mesures comme le poids à la naissance, le poids à 140 jours, le poids de la dernière pesée en vif, l'âge de dernière pesée en vif et le gain moyen quotidien. Les autres sont semi-quantitatives et correspondent à des classes de valeurs

Tableau 4 : Récapitulatif des 25 variables prises en comptes dans l'analyse.

Variabiles	Nom complet de la variable	Mesures ou classes de valeurs	
<u>Mesures en vif</u>			
P_NAIS	poids à la naissance	Mesure en Kg	
p140	poids vif à 140 j	Mesure en Kg	
gmq	gain moyen quotidien	Mesure en Kg. J ⁻¹	
age_fin	âge dernière pesée en vif	Mesure en Kg	
pv_fin	dernier poids vif	Mesure en Kg	
<u>Pointages en vif</u>			
arri_v	pointage arrière	1=plat	18=très rebondi
dess_v	pointage dessus	1=plat	18=très rebondi
epau_v	pointage épaule	1=plat	18=très rebondi
synt_v	pointage synthétique muscularité	1=plat	18=très rebondi
vent_v	pointage rétraction ventre	1=gros ventre	18=ventre "rentré"
os_v	finesse os canon	1=très gros	18=très fin
cuir_v	finesse du cuir	1=épais	18=très fin
etat_v	note d'état	1=très maigre	18=très gras
<u>Mesures à l'abattage</u>			
rdt_c	rendement en carcasse	Sans unité	
p_carc	poids de carcasse	Mesure en Kg	
<u>Pointages en carcasse</u>			
arri_c	pointage arrière	1=plat	18=très rebondi
dess_c	pointage dessus	1=plat	18=très rebondi
epau_c	pointage épaule	1=plat	18=très rebondi
synt_c	pointage synthétique muscularité	1=plat	18=très rebondi
n_couv	pointage gras couverture	1=très maigre	18=très gras
n_intr	pointage gras interne	1=très maigre	18=très gras
COUL_C	couleur viande	1=rose clair	10=rouge foncé
CUDG	épaisseur de cuisse	Mesure en cm	
	longueur de cuisse du jarret à la		
JSDG	symphyse pubienne	Mesure en cm	
LTDG	longueur de carcasse	Mesure en cm	

(tableau 4). Par exemple, la couleur de la viande est estimée par une échelle de 1 (rosé) à 10 (rouge foncé). Les pointages sont quantifiés en 18 classes de 1 (peu prononcé ou maigre) à 18 (très prononcé ou gras).

Au total, cinq facteurs (ou variables explicatives) ont été étudiés :

- Les lignées : elles sont au nombre de deux. Soit les animaux analysés sont de génération back-cross (CARBC), soit de génération F2 (CARF2).
- Le sexe : (1) pour le sexe mâle et (2) pour le sexe femelle.
- Les dates d'abattages : il y a eu 5 dates d'abattage (01/03/11, 07/06/11, 08/03/11, 12/04/11 et 17/05/11).
- Le père : 3 mâles reproducteurs ont été utilisés pour les croisements (A, B ou C).
- Le génotype : G/G , G/T ou T/T .

Pour déduire l'influence relative des différents facteurs sur les variables quantitatives, nous avons utilisé le modèle GLM (*Generalized Linear Model*). L'avantage de ce modèle est qu'il prend en compte simultanément tous les effets que l'on suspecte d'influencer les variables dépendantes, ce qui permet une bonne significativité de ces résultats. Le génotype a été considéré comme un des 5 facteurs pouvant influencer sur chacune des 25 variables dépendantes dans le modèle GLM.

Dans tous les résultats, les probabilités associées aux tests seront codées de la manière suivante : * : $P\text{-value} \leq 0,05$; ** : $P\text{-value} \leq 0,01$; *** : $P\text{-value} \leq 0,001$; NS (non significatif) : $P\text{-value} \geq 0,06$. Les valeurs comprises entre 0,05 et 0,06 sont considérées comme marginalement significatives et assimilées à des valeurs significatives.

La dominance de l'allèle G par rapport à l'allèle T pour une variable donnée se calcule par la formule suivante :

$$\text{Dominance} = \frac{[G/T] - ([G/G] + [T/T])}{2}$$

2

Ainsi, si la mesure du phénotype de l'hétérozygote se rapproche de celui de l'homozygote G/G , et si le phénotype de G/G a une mesure supérieure à celui de T/T alors la dominance est positive et partielle. Si par contre le phénotype de l'hétérozygote se rapproche de celui de l'homozygote T/T , on obtient une récessivité (dominance négative). Si par contre les mesures des phénotypes G/G sont inférieures à celles des phénotypes T/T , les valeurs de dominance sont inverses par rapport aux deux cas précédents.

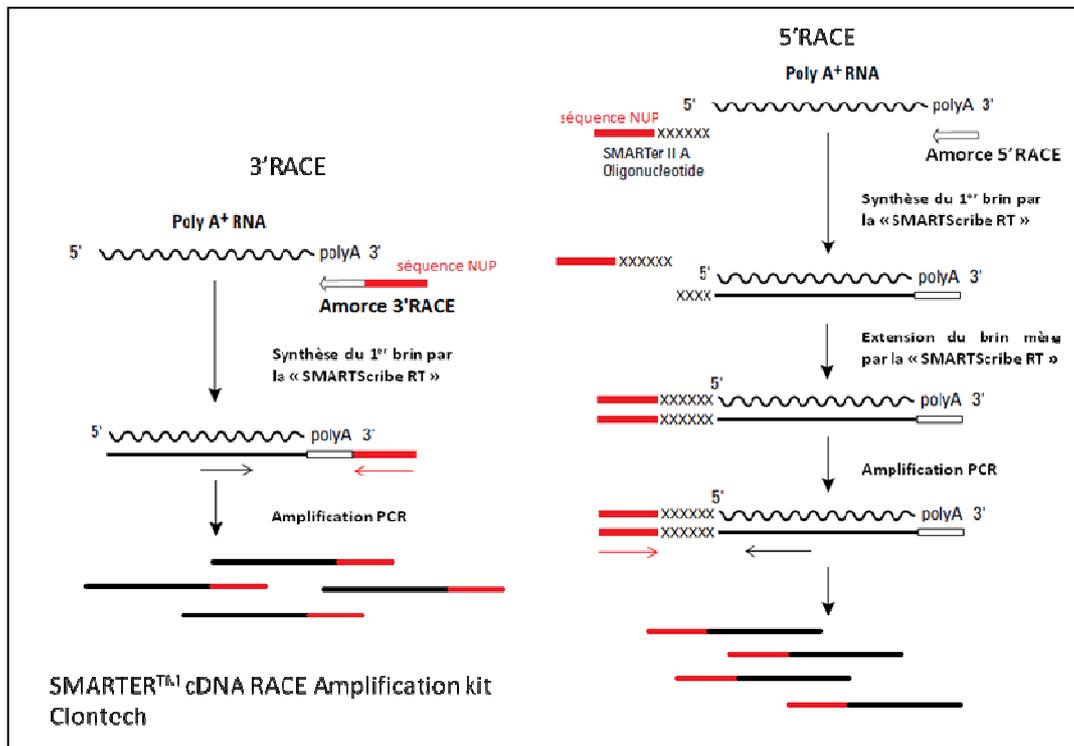


Figure 29 : Principe de la RACE.

3'RACE : L'amorce 3'RACE contient une séquence de 30 (T) en amont de la séquence NUP et s'hybride aux queues poly(A) des ARNm. L'enzyme de rétrotranscription « SMARTScribe RT » permet la synthèse du brin complémentaire à l'ARNm. 5'RACE : L'amorce 5'RACE contient une séquence oligod(T) qui s'hybride à la queue poly(A). L'enzyme de rétrotranscription « SMARTScribe RT » synthétise et ajoute quelques nucléotides en amont du brin complémentaire, ce qui va permet à l'oligonucléotide « SmarterIIA » de s'hybrider. L'enzyme de rétrotranscription synthétise le brin complémentaire en ajoutant la séquence complémentaire à la séquence NUP.

L'effet additif s'obtient par la demi-différence entre les valeurs phénotypiques des deux homozygotes :

$$\text{Effet additif} = \frac{[G/G] - [T/T]}{2}$$

Ainsi, si le phénotype de *G/G* a une mesure supérieure à celui de *T/T*, le gain est positif.

7. 5' et 3' RACE

Les tests de 5' et 3'RACE, dont le principe est décrit figure 29, ont été réalisés en utilisant le kit *SMARTERTM cDNA RACE Amplification kit* de chez Clontech en suivant les instructions du fabricant.

Les ARN sont rétrotranscrits grâce au kit, puis les ADNc sont amplifiés par double PCR avec des amorces correspondantes aux adaptateurs fournis (UPM puis NUP) dans un sens, et les amorces (5'-ATGGCTTCTAGTCTTGAGGATGTAGT-3' puis 5'-TCTGCTCGCGTTCTCATT CAGATCC-3') pour l'amplification de la région 5'UTR et les amorces (5'-AAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATGTGAA-3' puis 5'-CAAAAGTATCCTCATAACCA TCTTGTGCAC-3') pour l'amplification de la région 3'UTR avec la *Taq DNA polymérase Long template fragment Amplification* (Roche), selon les conditions suivantes : un cycle à 95°C pendant 2min, 35 cycles de dénaturation 95°C 15s/ hybridation 61°C 30s/ élongation 68°C 2min, et un cycle d'élongation à 68°C pendant 5min. Le séquençage des produits d'amplification est réalisé de la même manière que décrit précédemment (cf. p.143).

8. Test Luciférase

a) Construction plasmidique

Afin d'évaluer l'impact de la longueur de la séquence 3'UTR des transcrits du gène *myostatine* sur l'expression de la protéine nous avons inséré des séquences 3'UTR de taille variable en aval de la séquence codante de la luciférase dans le plasmide *PmiR-Glo Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* (Promega).

À partir d'ADN génomique, nous avons amplifié les séquences d'intérêts grâce à l'utilisation d'amorces contenant des sites de restrictions *XbaI* pour l'amorce sens et *Sall* pour les amorces

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification PCR de séquences 3'UTR de tailles variables.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce 5'- 3'
CI103XbaI	ATTCTAGAGGTCTATATTTGGTTCATAGCT
CI104Sall	TAGTCGACTAGCTCATATACTGTAGCTTGT
CI105Sall	TAGTCGACTGATGGTTAAATGCCAACCATATA
CI106Sall	TAGTCGACTCACCAGAAGACAAGGAGAATT
CI107Sall	TAGTCGACTGTAAATATTAAGTGAAACTGT
CI108Sall	ATGTCGACTACAAAACAATATTGTATACAT
CI109Sall	TAGTCGACTATTCTGATTTTCAGATAATAGA
CI110Sall	TAGTCGACTAAGATATCATCAGTTTATTAT
CI111Sall	TAGTCGACTGATTAACAAAATCCTGATTTA
CI112Sall	TAGTCGACTAATCATAAGTACAATTTATTT
CI113Sall	TAGTCGACTATAACTTAAATTGTTTCTACA
CI114Sall	TAGTCGACTCTTTCAAAAAAGGTGAAAACA

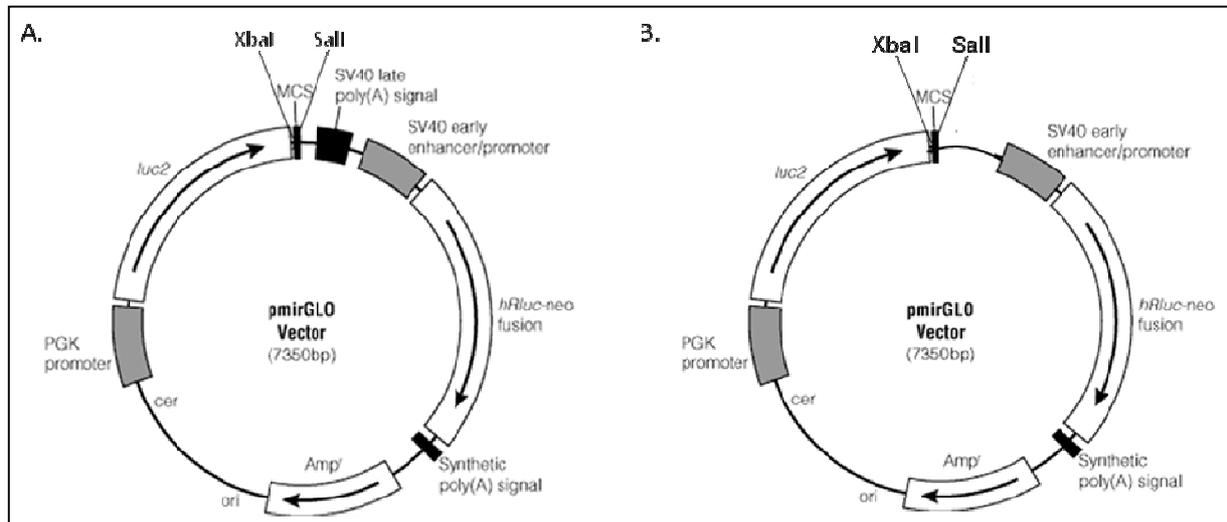


Figure 30 : Plasmide *PmiR-Glo Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* modifié.

A, Les séquences 3'UTR ont été insérées dans le site de clonage multiple grâce à l'utilisation des enzymes de restriction *XbaI* et *Sall*. **B,** Délétion de la séquence signal *SV40 late poly(A) signal*.

antisens (tableau 5). Nous avons réalisé une ligature de ces produits d'amplifications dans le plasmide *TopoXL* (Invitrogen) afin d'en faciliter la digestion.

Le plasmide *PmiR-Glo Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* a été digéré par les enzymes *XbaI* et *Sall* (15µl de plasmides traités avec 1µl *XbaI*, 1µl *Sall*, 5 µl tampon dans 50µl final, puis incubés 3h à 37°C) afin d'y insérer les produits d'amplifications obtenus précédemment.

Dans le test n°1, nous avons inséré les séquences 3'UTR de taille variable dans le site de clonage multiple grâce aux sites de restriction *XbaI* et *Sall* (Fig. 30A).

Dans le test n°2 nous avons délété le plasmide de sa séquence signal de polyadénylation (*SV40 late poly(A) signal*) et inséré les séquences 3'UTR de tailles variables dans le site de clonage multiple grâce aux sites de restriction *XbaI* et *Sall* (Fig. 30B). La délétion de la séquence signal Poly(A) de SV40 a été réalisé par digestion enzymatique du plasmide en utilisant les enzymes de restrictions *KpnI* et *NotI* (5µl de plasmides traités avec 1µl de *KpnI*, 1µl de *NotI*, 2µ tampon dans 20µl final, puis incubés 2h à 37°C).

Les produits d'amplification digérés sont incubés avec le plasmide digéré en présence de *T4 DNA ligase* (Biolabs) afin d'effectuer la ligature de ces produits d'amplification dans le plasmide. Après transformation bactérienne et sélection des bactéries positives, les plasmides positifs sont purifiés par maxi-prep avec le kit *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) en suivant les instructions du fabricant. Les plasmides sont ensuite prêts à être transfectés dans des cellules myoblastiques de souris de lignée C2C12.

b) Culture cellulaire et transfection

Des cellules C2C12 de stade P6 sontensemencées (J1) dans une plaque 48 puits avec 15 000 cellules par puits et dans deux plaques 6 puits avec 120 000 cellules par puits contenant du milieu de croissance GM (milieu DMEM, 10% SVF, 50U/ml pénicilline, 0,05% streptomycine). La plaque 48 puitsensemencée permettra la détection de la luminescence produite par l'expression de la luciférase dans chaque puits, après la transfection en triplicat des plasmides *PmiR-glo* purifiés précédemment, contenant des séquences 3'UTR variables. La plaque 6 puits nous sert à l'extraction des ARN produits par les cellules de chaque puits, après la transfection des plasmides contenant ces séquences 3'UTR variables. L'analyse par RACE des ARN extraits permettra d'identifier les différents transcrits produits par ces cellules transfectées avec les

plasmides contenant des séquences 3'UTR variables et de vérifier qu'ils ont leur propre queue polyA et pas celle du vecteur pour le test 1.

Le lendemain de l'ensemencement (J2), les cellules sont transfectées avec le plasmide grâce à l'utilisation de l'agent transfectant Xtremegene (Roche) en suivant les instructions du fabricant. Chaque puits de la plaque 48 puits est traité avec 0,6µg de plasmide et 1,8µl d'Xtremegene (mélange préparé dans 30µl de milieu optimem) avec 270µl de milieu de croissance GM.

Chaque puits de la plaque 6 puits est traité avec 3µg de plasmide et 9µl d'Xtremegene (mélange préparé dans 150µl de milieu optimem) avec 1,35ml de milieu de croissance GM. Le milieu est changé à J3 et la luminescence révélée à J4.

La quantité relative d'expression de la luciférase est dosée par mesure de la luminescence grâce au kit *Dual-Glo® Luciferase assay* (Promega) en suivant les instructions du fabricant.

9. Western blot

Deux anticorps ont été testés sur des échantillons protéiques provenant de tissu musculaire *longissimus dorsi* d'animaux de race Blonde d'Aquitaine. Les échantillons musculaires sont broyés à l'azote liquide puis mis en solution RIPA (Tris 50mM pH8, NaCl 150mM, IGEPAL CA-630 1%, Desoxycholate sodique 0,5%, SDS 0,1%) à une concentration de 20µl de tampon par gramme de tissu pendant 2h à 4°C et homogénéisés à la seringue. Après une centrifugation de 20min à 10 000g à 4°C, le surnageant est récupéré et dosé.

Anticorps anti-myostatine dirigé contre la partie bioactive de la myostatine (Bethyl Laboratories) : Anticorps primaire polyclonal produit chez le lapin. Il cible la séquence peptidique « NMLYFNGKEQIIYGKI » humaine à partir du résidu 349 (Gonzalez-Cadavid et al., 1998). Les échantillons sont prétraités avec du DTT (0,1µl/µg), puis dénaturés 10 min à 95°C et sont déposés sur un gel tris-glycine acrylamide 15%, pour migration électrophorétique. Le transfert est effectué pendant 1h sur membrane de nitrocellulose à 0,8mA/cm². Après une étape de saturation dans une solution bloquante 1% (Roche)-TBS, l'anticorps est utilisé au 1/500^{ème} à 4°C toute la nuit sur la membrane dans la solution bloquante 0,5%-TBS, puis couplé à un anticorps secondaire anti-lapin (Dako) utilisé lui aussi au 1/1000^{ème} à température ambiante pendant 1h dans la solution bloquante 0,5%-TBS. Après des lavages au TBS, la présence de la

protéine est révélée par le réactif *Enhanced Chemiluminescent* (Roche) et l'utilisation de film photographique.

Anticorps anti-myostatine dirigé contre le propeptide de la myostatine (Sigma-Aldrich) : Anticorps primaire polyclonal produit chez le lapin. Il cible une séquence peptidique « RSLKLDMNPGTGIWQ » à partir du résidu 191. Les échantillons sont prétraités avec du DTT (0,1µl/µg), puis dénaturés 10 min à 95°C et sont déposés sur un gel acrylamide tris-glycine de résolution de 15% pour migration électrophorétique. Le transfert est effectué pendant 90min sur membrane de nitrocellulose à 0,8mA/cm². Après une étape de saturation dans une solution bloquante 1%-TBS, l'anticorps est utilisé au 1/250^{ème} à 4°C toute la nuit sur la membrane dans la solution bloquante 0,5%-TBS, puis couplé à l'anticorps secondaire anti-lapin utilisé au 1/1000^{ème} à température ambiante pendant 1h dans la solution bloquante 0,5%-TBS. Après des lavages au TBS-T 0,05%, la présence de la protéine est révélée par le réactif *Enhanced Chemiluminescent* (Roche) et l'utilisation de film photographique.

De la myostatine monomérique pure (partie C-terminale) ou son propeptide pur (R&D systems) ont servis d'échantillons contrôle positif et négatif.

10. Test Elisa

Des prélèvements de sang ont été réalisés sur des animaux de race Blonde d'Aquitaine (Station de Soual), Limousin (Station de Moussours, Uzerche) et Salers (Station du Fau Soubro, Saint-Bonnet-de-Salers). Ces échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 10min à 1100g à température ambiante afin d'en récupérer le sérum. Les tests Elisa sont réalisés en utilisant le kit Quantikine® ELISA GDF-8/Myostatine (R&D systems). Au préalable, 20µl de sérum par animal est ensuite traité avec 10µl d'HCl 1N, incubé pendant 10min à température ambiante puis traité avec 10µl de NaOH 1,2N/HEPES 0,5M, puis dilué dans une solution « calibrateur » fourni dans le kit. Après avoir suivi les instructions du fabricant, le taux de myostatine globale dans chaque échantillon est dosé par absorbance à une longueur d'onde de 450nm. La concentration correspondante, en pg/ml, est obtenue en utilisant le logiciel MARS *Data analysis software* (BMG Labtech).

RÉSULTATS
ET
DISCUSSION



Figure 31 : Animaux hypermusclé de races Blanc Bleu Belge (A) et Blonde d'Aquitaine (B).

On observe nettement le phénotype extrême chez l'animal de race Blanc Bleu Belge (A) comparé à l'animal de race Blonde d'Aquitaine (B) qui présente un phénotype hypermusclé plus modéré. (Photo A de Druet et al., 2014).

Résultats et discussion

I. Découverte de l'allèle favorable à une hypertrophie musculaire chez la race Blonde d'Aquitaine

1. Hypothèse de travail

Chez le bovin, plusieurs mutations (cf. Introduction Bibliographique II. 6.) pertes de fonctions du gène *myostatine* conduisant à différents degrés d'hypertrophies musculaires ont été identifiées (Grobet et al., 1997, 1998; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997). Un phénotype extrême a été décrit chez la race bovine Blanc Bleu Belge (Fig. 31A).

La race bovine Blonde d'Aquitaine (Fig. 31B) quant à elle, présente une hypertrophie musculaire plus modérée avec une certaine variabilité communément observée entre les animaux. En dépit de nombreux travaux dédiés à élucider l'origine génétique du caractère « développement musculaire » chez la Blonde d'Aquitaine, aucune mutation causale n'a été rapportée à l'instar des autres races bovines étudiées. Néanmoins, ces travaux n'ont pas exclu la possibilité d'un transcrite aberrant du gène *myostatine*. Dans ce contexte, notre hypothèse de travail se base sur un diagnostic approprié d'une telle situation chez la Blonde d'Aquitaine en passant par une analyse quantitative et qualitative de la structure primaire de l'ARNm du gène *myostatine*. Même si l'aspect quantitatif a été exclu par des travaux précédents (Karim et al., 2000), une structure aberrante des transcrits du gène *myostatine* pourrait échapper aux mécanismes de surveillances cellulaires et être à l'origine du phénotype d'hypertrophie musculaire observé.

2. Analyse de la structure primaire des transcrits du gène *myostatine* et découverte d'un nouvel allèle *mh* chez la Blonde d'Aquitaine

L'analyse fine de la structure primaire du transcrite du gène *myostatine* a débuté par le séquençage de sa séquence codante. Pour cela, nous avons extrait et rétrotranscrit les ARNm en

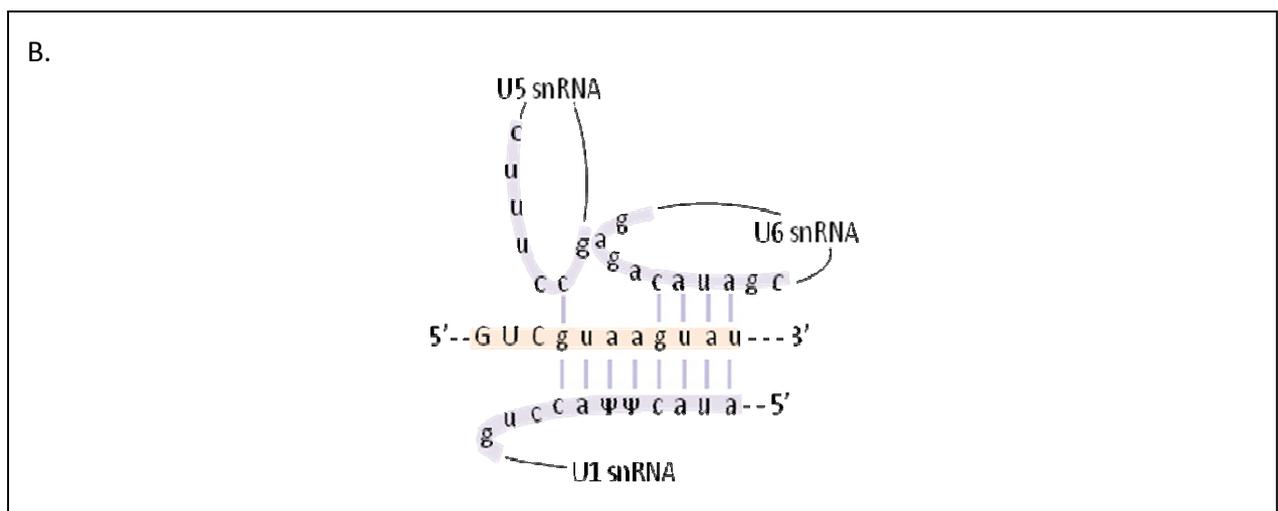
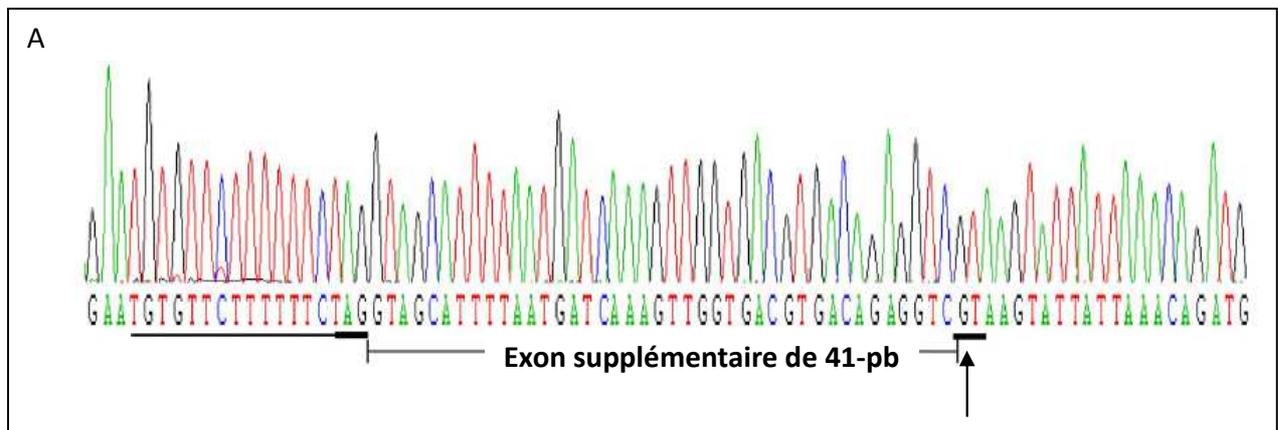


Figure 32 : Un environnement propice à l'épissage.

A, La substitution T→G (flèche) crée un site donneur d'épissage (GT, souligné) dans un environnement en *cis* fort avec la présence en amont du dinucléotide AG et d'une séquence polypyrimidique (souligné) (Bouyer et al., 2014). **B**, En aval une séquence qui suit le dinucléotide GT, propice à une complémentarité avec des snRNA du complexe d'épissage.

ADNc à partir de tissus musculaires provenant de 10 animaux de race pure Blonde d'Aquitaine. L'amplification de la séquence correspondant au cadre de lecture ouvert et l'établissement de sa structure primaire par séquençage direct des produits d'amplification révèle que les transcrits du gène *myostatine* chez la Blonde d'Aquitaine se caractérisent par un exon supplémentaire de 41-pb entre le 2^{ème} et le 3^{ème} exon légitime. La séquence correspondante est assurément issue de l'intron 2 par une activité effective supplémentaire du splicéosome. L'établissement de la séquence primaire de la totalité de l'intron 2 des 10 animaux de race Blonde d'Aquitaine révèle un seul polymorphisme *T3811* → *G3811*. Cette mutation engendre la création d'un nouveau site donneur d'épissage dans un environnement en *cis* très favorable à l'inclusion des 41-pb par le splicéosome. En effet, la mutation permet un appariement parfait avec les snRNA impliqués dans l'activité du splicéosome (Fig. 32). De plus, en amont des 41-pb et de façon adjacente, il existe naturellement un site accepteur d'épissage parfait. Ainsi, le splicéosome se voit imposer l'insertion de l'exon supplémentaire de 41-pb.

À la suite de cette insertion, les transcrits possédant cette séquence exonique supplémentaire prédisent la production d'une protéine tronquée de toute sa partie C-terminale bioactive. En effet, l'insertion engendre l'apparition prématurée de deux codons STOP successifs dans le cadre de lecture ouvert. Ce transcrit atypique est détectable en RT-PCR et en RT-qPCR ce qui dénote de sa relative stabilité. En effet, il ne semble pas être la cible des mécanismes de surveillance comme le NMD (*nonsense-mediated decay*) qui ne détecte pas les codons STOP prématurés situés à moins de 50 nucléotides de la dernière jonction exon-exon (Isken and Maquat, 2007). Par ailleurs, la production de ce transcrit aberrant n'est pas stricte : l'activité du splicéosome permet aussi la production d'un transcrit sauvage, à un niveau résiduel même chez les animaux homozygotes pour la mutation.

La forte représentativité du transcrit aberrant résulterait de la concomitance de deux évènements : i) le transcrit aberrant échapperait au NMD ii) la dérégulation du gène *myostatine* qui résulterait de l'absence d'un seuil de myostatine fonctionnelle requis pour une rétroinhibition. En effet il a été montré que la myostatine autorégule son propre gène *via* SMAD7, un inhibiteur puissant des voies de signalisation TGF- β et activines (Forbes et al., 2006).

La découverte de cet allèle atypique (*T3811* → *G3811*) par rapport aux autres allèles du gène *myostatine* déjà identifiés chez le bovin, ainsi que les méthodes employées pour y parvenir sont décrites plus en détail dans la publication suivante.

Deep Intronic Mutation and Pseudo Exon Activation as a Novel Muscular Hypertrophy Modifier in Cattle

Claire Bouyer, Lionel Forestier, Gilles Renand, Ahmad Oulmouden.

Plos one. 2014.

DOI: [10.1371/journal.pone.0097399](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097399).

Deep Intronic Mutation and Pseudo Exon Activation as a Novel Muscular Hypertrophy Modifier in Cattle

Claire Bouyer¹, Lionel Forestier¹, Gilles Renand², Ahmad Oulmouden^{1*}

1 Unité Mixte de Recherche (UMR) 1061 INRA/Université de Limoges, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Limoges, France, 2 UMR 1313 INRA, Unité de Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-Josas, France

Abstract

Myostatin is essential for proper regulation of myogenesis, and inactivation of Myostatin results in muscle hypertrophy. Here, we identified an unexpected mutation in the *myostatin* gene which is almost fixed in Blonde d'Aquitaine cattle. In skeletal muscle, the mutant allele was highly expressed leading to an abnormal transcript consisting of a 41-bp inclusion and premature termination codons and to residual levels of a correctly spliced transcript. This expression pattern, caused by a leaky intronic mutation with regard to spliceosome activity and its apparent stability with regard to surveillance mechanisms, could contribute to the moderate muscle hypertrophy in this cattle breed. This finding is of importance for genetic counseling for meat quantity and quality in livestock production and possibly to manipulate *myostatin* pre-mRNA in human muscle diseases.

Citation: Bouyer C, Forestier L, Renand G, Oulmouden A (2014) Deep Intronic Mutation and Pseudo Exon Activation as a Novel Muscular Hypertrophy Modifier in Cattle. PLoS ONE 9(5): e97399. doi:10.1371/journal.pone.0097399

Editor: Diego Fraidraich, Rutgers University -New Jersey Medical School, United States of America

Received: December 19, 2013; **Accepted:** April 17, 2014; **Published:** May 14, 2014

Copyright: © 2014 Bouyer et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by the Université de Limoges, Région Limousin and INRA, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ahmad.oulmouden@unilim.fr

Introduction

Myostatin, a member of the transforming growth factor beta (TGF- β) superfamily, functions as a negative regulator of skeletal muscle development and growth. Myostatin is expressed almost exclusively in cells of the skeletal muscle lineage, from the embryonic myotome to striated muscle in adults [1]. The *myostatin* gene has been highly conserved throughout evolution, particularly at the third exon encoding the entire bioactive COOH-terminal in all vertebrate homologs [2,3]. Like other TGF- β superfamily members, Myostatin is synthesized in a precursor form which dimerizes via disulfide bonds and undergoes three proteolytic cleavages. Removal of the signal peptide sequence is followed by cleavage at a tetrabasic processing site, resulting in a NH₂-terminal propeptide and a COOH-terminal peptide. Following this proteolytic processing, the propeptide and disulfide-linked C-terminal dimer remain noncovalently bound in a latent complex. Activation of latent Myostatin can occur by proteolytic cleavage of the propeptide by members of the BMP 1/tolloid family of metalloproteinases, which causes dissociation of the latent complex [4].

Since its discovery in mice in 1997 [1], the *myostatin* gene has been extensively investigated considering the potential benefits of enhancing muscle growth in clinical and agricultural settings. Loss-of-function mutations which impair Myostatin function or those which knockdown *myostatin* gene expression, result in muscle hypertrophy often referred to as “double-muscling” [5–10] whereas *myostatin* overexpression induces profound muscle loss [11]. In humans, the first natural *myostatin* mutation has been identified in a young boy [12]. Building on these results, a number of strategies including the use of Myostatin inhibitors or antisense

oligonucleotides to manipulate *myostatin* pre-mRNA splicing are being developed for the treatment of muscle-wasting disorders such as Duchenne muscular dystrophy [13,14].

In cattle, several mutations that cause different degrees of hypermuscularity have been reported. The most extreme phenotype is seen in the Belgian Blue breed (BBB) [7]. The well-muscled French Blonde d'Aquitaine breed (BAB) is renowned for producing high-yielding beef carcasses and displays a less hypertrophic phenotype (Fig. 1) with certain variations in muscle conformation commonly observed between animals. Based on the absence of an altered amino-acid sequence and reduced *myostatin* mRNA levels, the *myostatin* gene does not seem to be responsible for muscle phenotype in BAB [8,15]. However, these studies did not rule out the existence of an aberrant transcript that may escape surveillance mechanisms.

Here, we identified an unexpected mutation in the *myostatin* gene. In skeletal muscle, the mutant allele was highly expressed leading to an abnormal transcript with a premature termination codon and to residual levels of a correctly spliced transcript.

Results

Aberrant *myostatin* mRNA

We studied potential transcript abnormalities that could be caused by an intronic mutation. For this, we sequenced the 1.582-kb *myostatin* cDNA obtained by RT-PCR in Blonde d'Aquitaine *longissimus dorsi*, a hypertrophied skeletal muscle in cattle. The amplification products (Fig. 2) encompassed the three coding exons which were 35-bp upstream and 420-bp downstream of the open reading frame respectively. At first glance, these results suggested that BAB animals produce correctly spliced *myostatin*



Figure 1. A Blonde d'Aquitaine bull homozygous for the $T3811>G3811$ mutation exhibiting muscle hypertrophy.
doi:10.1371/journal.pone.0097399.g001

mRNA. Unexpectedly, direct sequencing of these PCR products in 10 fullblood BAB animals revealed a 41-bp insertion between exons 2 and 3 in 9 animals (Fig. 3A, B). The tenth animal exhibited both aberrant and correctly spliced transcripts. Furthermore, this extra exon inclusion contained two successive premature termination codons (PTC). Translation of this aberrant transcript predicts a truncated protein lacking the entire bioactive region [2,3] encoded by exon 3 (Fig. 3C). Examination of the genomic sequence of the *myostatin* gene showed that the 41-bp insertion was located in intron 2. Closer examination of the flanking sequences showed that this pseudoxon intronic sequence was preceded by a perfect 3' acceptor splice site (Fig. 4).

Causative mutation

To identify the cause of this aberrant splicing we carried out genomic DNA sequencing of the entire intron 2 (2.033-kb) in the ten animals. Direct sequencing of PCR products revealed a $T3811>G3811$ deep intronic mutation (numbering from the first base of the translation codon at the genomic level). Remarkably, the mutation created a new 5' donor splice site. Nine animals were

found G/G homozygous (Fig. 4A) and the tenth was T/G heterozygous as expected (Fig. 4B). We did not find any other changes in the remaining intron 2 sequence. These results suggest that the intronic "exonisation" discovered in the BAB animals was caused by a perfect preexistent 3' acceptor splice site and the $T3811>G3811$ mutation. This substitution seems to generate a strong cryptic 5' donor splice site (Fig. 4). This assumption is supported by the fact that we could not detect any wild-type transcripts by direct cDNA sequencing of all homozygous G/G animals (Fig. 3) whereas the heterozygous G/T animal exhibited both wild-type and abnormal transcripts.

Genotyping in different cattle breeds

We genotyped 445 animals from several European cattle breeds by RFLP-PCR (Fig. 5) for the deep intronic mutation. We found that the mutation was almost fixed in BAB (Table 1); all animals belonging to other cattle breeds were wild-type. Taken together, our findings identify a deep intronic mutation ($T3811>G3811$) leading to an aberrant *myostatin* mRNA. This likely results in a truncated Myostatin, lacking the entire bioactive region and hence reduction in functional Myostatin concentrations contributing to muscular hypertrophy in animals belonging to Blonde d'Aquitaine breed.

Relative stability of mRNA-containing premature stop codons

The most striking result revealed by our work was the apparent stability of the aberrant transcript despite the presence of premature termination codons as assessed by RT-PCR and direct sequencing (Fig. 2 and Fig. 3). Indeed, eukaryotic mRNAs harboring a PTC are often the targets of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) [16].

To gain more insight into the expression and stability of this aberrant transcript, we developed (Fig. 6A) TaqMan real-time quantitative RT-PCR assays targeted specifically to the 41-bp inclusion (in G/G or G/T animals) or both to wild-type and abnormal transcripts (in G/G , G/T or T/T animals). As expected, the commonly used TaqMan probe detected *myostatin* mRNA in all animals regardless of their genotype (Fig. 6B). Indeed, the two

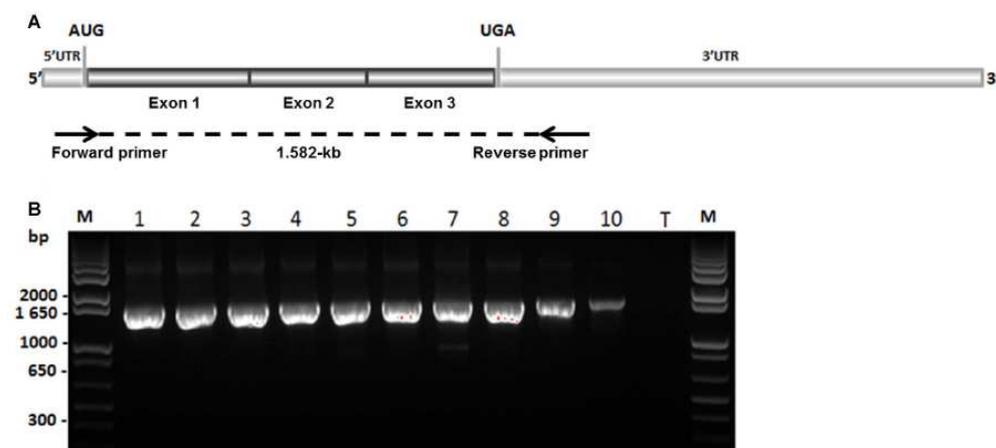


Figure 2. *myostatin* cDNA amplifications. (A) *myostatin* mRNA structure. Arrows show the primers used for PCR amplification. (B) PCR products obtained from *longissimus dorsi* cDNA samples of ten Blonde d'Aquitaine animals (1–10). The predicted size (A) is 1.582-kb. All the amplifications were directly sequenced by the same primers used for PCR amplifications (A). T: PCR assay without sample; M: size marker.
doi:10.1371/journal.pone.0097399.g002

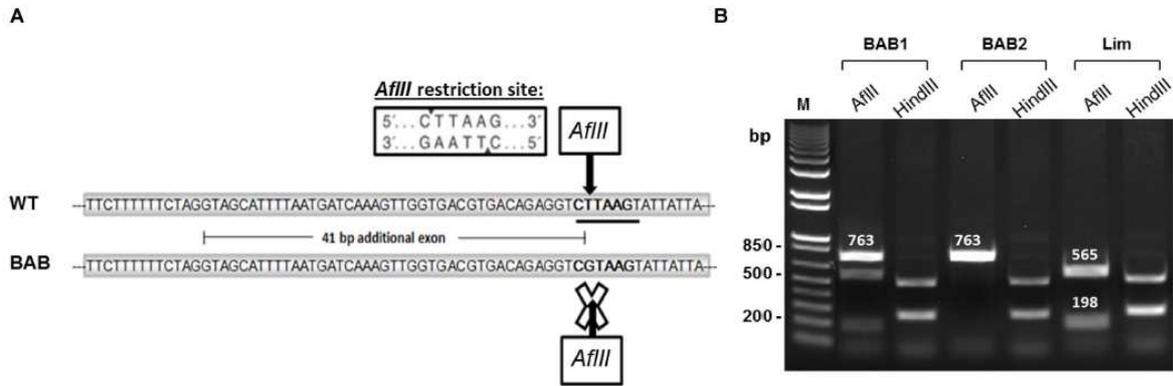


Figure 5. RFLP-PCR genotyping. (A) The T>G substitution leads to disappearance of the *AflIII* restriction site in Blonde d'Aquitaine (BAB). (B) PCR amplification products from two BAB animals and one Limousine animal (Lim) were digested either by *AflIII* or by *HindIII* restriction enzymes. *AflIII* digestion differentiates animals which are homozygous G/G (BAB2, no digestion, one 763-bp fragment), heterozygous T/G (BAB1, three fragments: undigested PCR products corresponding to the mutated allele (763-bp) and PCR products corresponding to the wild-type allele gave two 565-bp and 198-bp fragments) or homozygous T/T (Lim, two fragments: 565-bp and 198-bp). *HindIII* digestion was used as a cutting control. WT: wild-type; M: size marker.

doi:10.1371/journal.pone.0097399.g005

first exons were shared by abnormal and correctly spliced transcripts (Fig. 6A). The probe targeted to the 41-bp inclusion detected the aberrant transcript only in animals carrying at least

one *T3811>G3811* allele (Fig. 6C) as expected. This transcript remained undetectable in the two homozygous (T/T) animals used as control (Fig. 6C). Of note, although some fluctuations in

Table 1. Genotyping of the *T3811>G3811* mutation in European cattle breeds.

Breed/country	Number of animals	T/T	G/G	T/G
Blonde d'Aquitaine/France	60	6	50	4
Limousine/France	42	42	0	0
Aubrac/France	48	48	0	0
Salers/France	33	33	0	0
Maine Anjou/France	20	20	0	0
Parthenese/France	15	15	0	0
Charolaise/France	16	16	0	0
Montbeliarde/France	18	18	0	0
Simmentale/France	9	9	0	0
Prim'Holstein/France	9	9	0	0
Normande/France	10	10	0	0
Gasconne/France	2	2	0	0
Black Japanese/Japan	2	2	0	0
Brave/France	16	16	0	0
Camargue/France	17	17	0	0
Italian brown/Italia	15	15	0	0
Maremmana/Italia	9	9	0	0
Italian red Pezzata rossa/Italia	9	9	0	0
Italian Friesian/Italia	19	19	0	0
Piemontaise/Italia	29	29	0	0
Romagnola/Italia	19	19	0	0
Belgian Blue Breed/Belgium	6	6	0	0
Chianina/Italia	11	11	0	0
Marchigiana/Italia	11	11	0	0
Total	445	391	50	4

doi:10.1371/journal.pone.0097399.t001

expression were seen, both TaqMan probes showed a similar expression pattern in the 10 screened BAB animals (Fig. 6B, C). Interestingly, abnormal transcripts (with a PTC) were more plentiful than wild-type transcripts. Taken together, and although speculative, these results strongly suggest that expressed transcripts harboring PTCs escaped surveillance mechanisms, probably nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in this case. One plausible explanation of this NMD resistance is that the PTC is located less than 50 nucleotides from the last exon/exon junction (Fig. 3). In mammals, as a general rule, only a PTC which occurs more than 50 nucleotides upstream from the last exon/exon junction will be subjected to NMD [16]. Otherwise, the increased levels of *myostatin* mRNA in Blonde d'Aquitaine cattle as compared to Limousine cattle (Fig. 6) suggests a negative feedback loop for functional Myostatin (see discussion).

Residual level of wild-type mRNA

The genotyping studies above showed that the deep intronic mutation was almost fixed in Blonde d'Aquitaine cattle (Table 1). However, some differences in muscle phenotype conformation still exist suggesting that the mutation is leaky with regard to spliceosome activity. Although the wild-type transcript remained undetectable by direct PCR sequencing we performed RT-PCR on cDNA using specific primers to identify residual wild-type transcripts (Fig. 7). Interestingly, this analysis revealed that residual wild-type transcripts, likely resulting from leaky splicing, were apparently produced (Fig. 7B) in homozygous (*G/G*) animals at variable levels ranging from undetectable (lines: 3, 4, 5) to

detectable levels (lines: 1, 2, 6, 7, 8, 9) as compared to the *G/T* heterozygous animal (line 10). Aberrant transcripts were more expressed in *G/G* animals than in the *G/T* heterozygous animal (line 10). This result was confirmed by cloning and sequencing. Unfortunately, we were unable to quantify the residual correctly spliced transcript by either semi-quantitative RT-PCR or TaqMan real-time quantitative RT-PCR.

Discussion

Myostatin is a TGF- β superfamily member that acts as a negative regulator of skeletal muscle growth. Mice lacking Myostatin have a dramatic and widespread increase in skeletal muscle mass as a result of a combination of muscle fiber hypertrophy and hyperplasia [1]. Naturally occurring mutations in the *myostatin* gene also lead to hypermuscular phenotype in cattle breeds such as the Belgian Blue and Piedmontese [5–7]. Blonde d'Aquitaine cattle have a less hypertrophic phenotype (Fig. 1) with certain variations in muscle conformation commonly observed between animals.

Here, we have shown that *T3811>G3811* mutation within intron 2 of the *myostatin* gene (Fig. 4) is almost fixed in Blonde d'Aquitaine cattle (Table 1). This is a deep intronic mutation which creates an illegitimate strong cryptic 5' donor splice site (Fig. 4). In skeletal muscle, the mutant allele was highly expressed (Fig. 6 and Fig. 7C) leading to an abnormal transcript harboring a premature termination codon (Fig. 3C) and to residual levels of a correctly spliced transcript (Fig. 7B), likely resulting from leaky

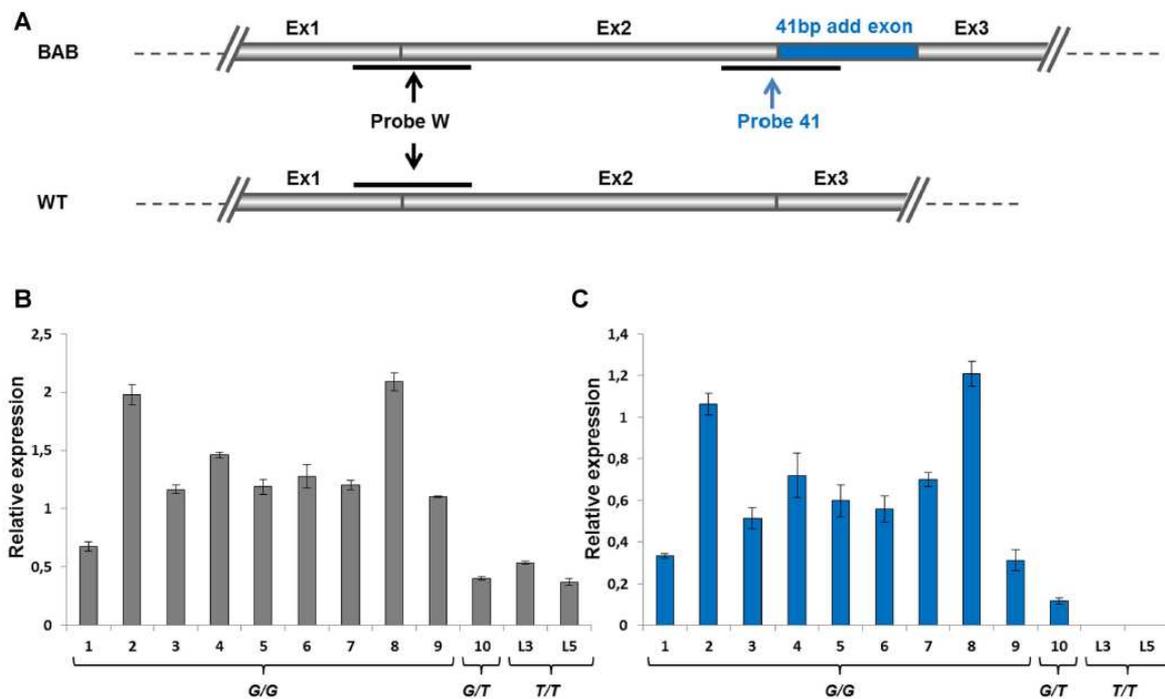


Figure 6. *myostatin* RT-qPCR transcripts. (A) Partial structure of the *myostatin* transcript from Blonde d'Aquitaine (BAB) and wild-type (WT) alleles. At top, the BAB allele contains the 41-bp additional exon (blue) and can be detected on qPCR by the probe 41 (blue) and probe W (black). At bottom, the wild-type allele, without the additional exon can only be detected by the probe W. Relative expression of *myostatin* transcript from twelve muscle samples detected by the probe W (B) and the probe 41 (C). 1-9: BAB homozygous (*G/G*) animals. 10: BAB heterozygous (*G/T*) animal. L3, L5: Limousine homozygous (*T/T*) animals.
doi:10.1371/journal.pone.0097399.g006

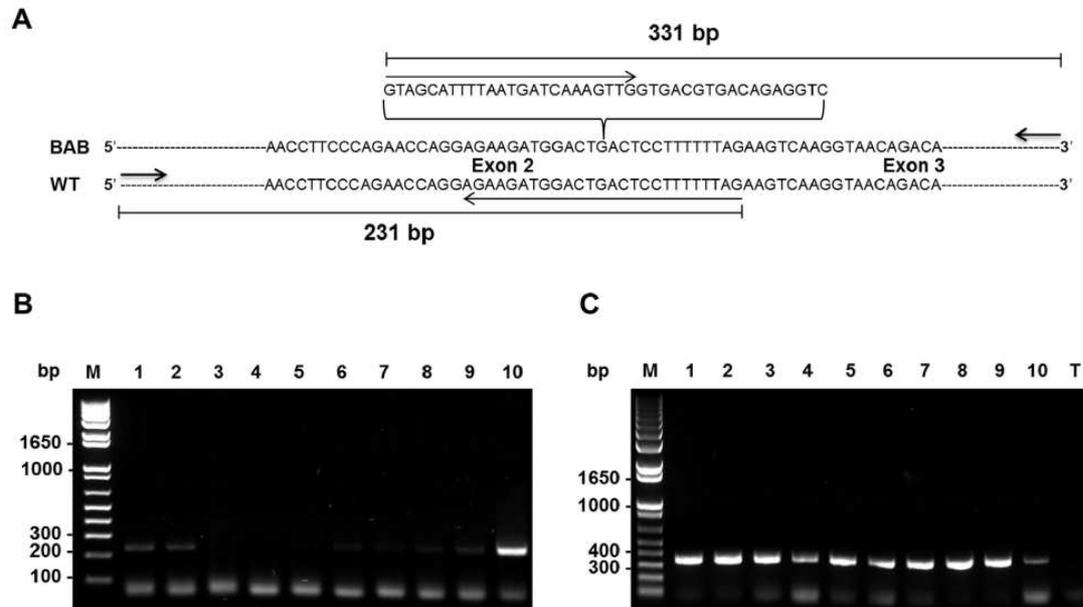


Figure 7. Residual wild-type transcripts. (A) Partial sequence at exon2/exon3 junction of *myostatin* cDNA in Blonde d'Aquitaine (BAB) and normal (WT) cattle. Extra-exonisation in BAB at exon2/exon3 (G/A) junction is indicated (bracket). Two specific primers (PCRWT-F/PCRWT-R and PCRBAB-F/PCRBAB-R, Table 2) were used to amplify either the correctly spliced (B) transcript (WT strand) or (C) the transcript with an extra exon (BAB strand). (C) The aberrant transcript was detected at relatively higher levels as compared to the heterozygous *G/T* animal (line 10) in agreement with real-time RT-qPCR data (Fig. 6). Of note, residual correctly spliced transcripts were detected in *G/G* animals at variable levels ranging from undetectable (lines: 3, 4, 5) to detectable levels (lines: 1, 2, 6, 7, 8, 9) as compared to the *G/T* heterozygous animal (line 10). T: PCR assay without sample; M: size marker.

doi:10.1371/journal.pone.0097399.g007

splicing. Translation of the aberrant transcript predicts a non-functional protein lacking the entire bioactive region [2,3] (Fig. 3C). This prediction is supported by the fact that *myostatin* gene is up-regulated (Fig. 6) in Blonde d'Aquitaine (see below). On the other hand, the residual correctly spliced transcript detected by RT-PCR (Fig. 7B), predicts that some functional Myostatin is also produced. Unfortunately, we were unable to quantify this residual correctly spliced transcript by both semi-quantitative RT-PCR and TaqMan real-time quantitative RT-PCR. However, although speculative, this expression profile might result in reduction in functional Myostatin concentrations and hence the moderate hypertrophic phenotypes of Blonde d'Aquitaine cattle.

Like other TGF- β superfamily members, the mature Myostatin signals via the activin type II receptors (ActRIIA and ActRIIB) and activin type I receptors (ALK4 and ALK5) to phosphorylate responsive Smad proteins (Smad2 and Smad3, Smad2/3), which enables the Smad proteins to form a transcriptional complex with Smad4 to transcribe target genes [17]. Myostatin activity is controlled at various levels by different mechanisms, including a range of extracellular antagonists that interact with Myostatin and prevent receptors activation [3,18,19]. Furthermore, several reports have shown that *myostatin* gene expression is regulated at the transcriptional level in humans and cattle through *cis* regulatory elements and *trans* acting factors [20,21]. Otherwise, expression studies revealed that there is increased expression of *myostatin* mRNA in the muscle of "double-muscling" cattle that carry a loss-of-function mutation in *myostatin* gene when compared to the expression in normal muscling cattle [22–24]. Based on these results, it has been suggested that Myostatin could regulate the expression of its own gene. Subsequently, it was confirmed that

Myostatin indeed auto-regulates its own expression by feedback loop via Smad7, a potent inhibitor of signaling by TGF- β and activins [25]. Of note, this study has shown that Belgian Blue cattle that express non-functional *myostatin* allele produce relatively higher quantities of *myostatin* mRNA in the *biceps femoris* muscle as compared to the normal cattle [25]. Our expression analysis is consistent with those data (Fig. 6 and Fig. 7). Virtually all *G/G* homozygous animals exhibit relatively higher levels of *myostatin* transcripts in the *longissimus dorsi* muscle as compared to both *G/T* heterozygous and *T/T* wild-type animals. Thus, up-regulation of the *myostatin* gene in *G/G* Blonde d'Aquitaine animals suggests that the negative feedback loop regulated by functional Myostatin is altered in this breed. Although it remains to be proven, these expression analyses suggest that non-functional Myostatin is produced in Blonde d'Aquitaine animals and is correlated with high levels of the aberrant transcript. In this regard, it will be of a great interest to compare this auto-regulation in Belgian Blue animals where a functional Myostatin protein is almost certainly not produced and in Blonde d'Aquitaine animals with a leaky mutation which probably produces some functional Myostatin from residual correctly spliced mRNA. This is all the more interesting since truncated Myostatin from Blonde d'Aquitaine cattle lacks the entire bioactive domain whereas that of the Belgian Blue breed exhibit a portion of the bioactive domain. Furthermore *myostatin* mRNA-containing PTCs that lead to each truncated Myostatin [5–7] seem to have escaped surveillance mechanisms, most likely nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in this case. In Blonde d'Aquitaine and Belgian Blue cattle, the PTC is located less than 50 nucleotides from the last exon/exon junction (Fig. 3) and in the last exon (that is not followed by an exon-exon

Table 2. List of primers used in this study.

Name	Sequence (5'-3')	Template	Objectives
Intron2-F	ACTGCTTACTGTTCTTTAACAGGAG	Genomic DNA	RFLP-PCR (Fig. 5)
Intron2-R	GAGAGGCACAGACTCAGAAGAAGATA		
PCRWT-F	ATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAG	cDNA	Wild-type RT-PCR (Fig. 7B)
PCRWT-R	AGAAGATGGACTGACTCCTTTTTTAG		
PCRBAB-F	GTAGCATTTTAATGATCAAAGTTG	cDNA	BAB RT-PCR (Fig. 7C)
PCRBAB-R	TGCTGTACTCCTACAAAGATGTCT		
Intron2seq-F	ATGTGAAGACAGTGTGCAGAAGCTGCTCA	Genomic DNA	Entire intron 2 amplification
Intron2seq-R	TCTGTGGAGTGTTCATCAACAATCAAGCCCA		
5'UTR-F-2	AGAACAAGGGAAAAGATTGTATTGATTTTA	cDNA	RT-PCR (Fig. 2)
3'UTR-R-2	AAATAATGGTATATAACAATACTGCA		

doi:10.1371/journal.pone.0097399.t002

junction) respectively. In mammals, as a general rule, only a PTC, which occurs at more than 50 nucleotides upstream from the last exon/exon junction, will be subjected to NMD [16].

In conclusion, we identified a mutation in the *myostatin* gene that most likely contributes to muscular hypertrophy of the Blonde d'Aquitaine breed. Taken together, it is attempting to speculate that this leaky mutation, with regard to splicing activity, appears to buffer the nonsense mutation and prevents extreme muscle overgrowth making it biologically significant in the context of mutations causing hypermuscularity. Indeed, extreme muscle overgrowth in cattle has disadvantages including reduction in female fertility, lower viability of offspring, delay in sexual maturation and systematic use of cesarean delivery due to large calf size. This finding is of importance for genetic counseling for meat quantity and quality in livestock production and possibly opens a new therapeutic option using *myostatin* pre-mRNA to treat human muscle diseases.

Materials and Methods

Blonde d'Aquitaine animals and muscle samples

Ten 12 months old Blonde d'Aquitaine bulls were used in this study. They were reared in the same conditions of feeding, housing and health status at the beef progeny test station of MIDATEST (Pyrénées Atlantiques, France). *Longissimus dorsi* samples were collected within 15 minutes after slaughter (slaughterhouse of Pau, France), cut into small pieces and immediately frozen in liquid nitrogen, transported to the laboratory and stored at -80°C until use. Muscle samples (used as controls) from two animals belonging to the Limousine breed were obtained from Limoges slaughterhouse (France).

DNA and RNA extractions

DNA was extracted from the ten muscle samples using the QIAamp DNA midi kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C . Total RNA was extracted from muscle samples using Tri reagent (Sigma-Aldrich) and treated with DNase I (Sigma-Aldrich) following manufacturer's instructions. The quality and quantity of RNA were evaluated by the Agilent 2000 bioanalyzer and conserved at -80°C until use.

RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR

RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR assays for RNA analysis were performed to detect an aberrant *myostatin* transcript (RT-PCR assay) that may escape surveillance mechanisms

(quantitative real-time RT-PCR). 2 μg of total RNA from the ten Blonde d'Aquitaine bulls and two Limousine animals were reverse-transcribed (RT) into cDNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). 100 ng (RNA equivalents) of cDNA for each sample were used as template (RT-PCR assay) to amplify the entire coding region of the *myostatin* transcript (Fig. 2A) or to detect residual wild-type transcripts (Fig. 7). PCR amplifications were carried out in a 25 μL reaction volume containing 10 pmol of each primer (Table 2) and 12.5 μL of 2X working concentration PCR Master Mix (ABgene, Thermo Scientific) with the following cycling conditions: initial denaturation at 95°C for 2 min followed by 35 cycles (95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 2 min) and one cycle (72°C for 5 min). PCR products (Fig. 2B) were purified with 1 μL ExoSAP-IT (USB products, Affymetrix) per 5 μL of PCR product, and then incubated 60 min at 37°C and 15 min at 80°C . Purified PCR products were sequenced on both strands using the same primers and the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions.

Quantitative real-time RT-PCR assays were performed in triplicate for each sample using 100 ng cDNAs prepared as described above. Relative amounts either of wild-type and aberrant *myostatin* transcripts or only aberrant transcripts were identified by the available Taqman probe (Bt03217979_m1) and a specific TaqMan probe (custom design service, Applied Biosystems) respectively. The positions of TaqMan probe hybridization targets are indicated in Figure 6. Two genes, *CASC3* (*cancer susceptibility candidate 3*, TaqMan probe: Bt0326991_m1) and *SF3A1* (*splicing factor 3a, subunit 1*, TaqMan probe: Bt03254301_m1) were used as internal control for more accurate normalization of expression data. cDNAs were amplified on an ABI PRISM©7900 system (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Relative mRNA expression values were calculated by the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method with normalization of each sample to the average change in cycle thresholds of controls.

myostatin intron 2 sequencing

The 2,033-kb of *myostatin* intron 2 was amplified from DNA from the ten Blonde d'Aquitaine animals using Taq DNA polymerase Expand Long Template (Roche Applied Science) according to manufacturer's instructions; intron2seq-F and intron2seq-R primers used are indicated in Table 2. PCR products were purified and sequenced on both strands as described above.

RFLP-PCR assays

We genotyped 445 animals from several European cattle breeds (Table 1) by RFLP-PCR (Fig. 5) for the deep intronic mutation (*T3811>G3811*). A 763-bp fragment encompassing the SNP was amplified by PCR from genomic DNA using Intron2-F and Intron2-R primers (Table 2), digested using *AflIII* restriction enzyme (Biolabs) and size fractionated by agarose gel electrophoresis (Fig. 5). The *T3811>G3811* SNP destroys a restriction site that cleaves the wild-type *T3811* allele (but not the mutated *G3811* allele) into 565-bp and 198-bp fragments (Fig. 5). Digestion by *HindIII* (a unique site shared between both alleles) was used as a cutting control.

Digestions with *AflIII* and *HindIII* were made using 10 μ l unpurified PCR products, 2 μ l enzyme buffer and 1 μ l restriction

enzyme in 20 μ l final volume. 0,2 μ l BSA were added for the *AflIII* digestion. Samples were incubated overnight at 37°C.

Acknowledgments

The authors thank sincerely MIDATEST for animal production and providing muscle samples, Dr. Hubert Levézuel for his help. We thank Dr. Ahmed Amine Khamlich and Dr. Jeanne Moreau for reading the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CB AO. Performed the experiments: CB LF GR AO. Analyzed the data: CB AO. Contributed reagents/materials/analysis tools: CB AO. Wrote the paper: CB AO. Directed the work: AO.

References

- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387: 83–90. doi:10.1038/387083a0
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, et al. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528–1534.
- Lee SJ, McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9306–9311. doi:10.1073/pnas.151270098
- Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, et al. (2003) Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15842–15846. doi:10.1073/pnas.2534946100
- McPherron AC, Lee SJ (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12457–12461.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ (1997) Mutations in myostatin (*GDF8*) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* 7: 910–916.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirotin D, Brouwers B, et al. (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat Genet* 17: 71–74. doi:10.1038/ng0997-71
- Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirotin D, et al. (1998) Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 9: 210–213.
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirotin D, Tordoix X, et al. (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 38: 813–818. doi:10.1038/ng1810
- Hu S, Ni W, Sai W, Zi H, Qiao J, et al. (2013) Knockdown of myostatin expression by RNAi enhances muscle growth in transgenic sheep. *PLoS One* 8: e58521. doi:10.1371/journal.pone.0058521
- Zimmers TA, Davies MV, Koniariis LG, Haynes P, Esqueda AF, et al. (2002) Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 296: 1486–1488. doi:10.1126/science.1069525
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, et al. (2004) Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* 350: 2682–2688. doi:10.1056/NEJMoa040933
- Kang JK, Malerba A, Poppelwell L, Foster K, Dickson G (2011) Antisense-induced myostatin exon skipping leads to muscle hypertrophy in mice following octa-guanidine morpholino oligomer treatment. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 19: 159–164. doi:10.1038/mt.2010.212
- Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umapathi P, Eagle A, et al. (2008) Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4318–4322. doi:10.1073/pnas.0709144105
- Karim L, Coppieters W, Grobet L, Valentini A, Georges M (2000) Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim Genet* 31: 396–399.
- Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21: 1833–1856. doi:10.1101/gad.1566807
- Han HQ, Zhou X, Mitch WE, Goldberg AL (2013) Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2333–2347. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.019
- Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, et al. (2002) The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* 277: 40735–40741. doi:10.1074/jbc.M206379200
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM, Wolfman NM (2003) Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol Baltim Md* 17: 1144–1154. doi:10.1210/me.2002-0366
- Ma K, Mallidis C, Artaza J, Taylor W, Gonzalez-Cadavid N, et al. (2001) Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E1128–E1136.
- Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martyn JK, et al. (2002) The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* 22: 7066–7082.
- Bass JJ, Oldham J, Sharma M, Kambadur R (1999) Growth factors controlling muscle development. *Domest Anim Endocrinol* 17: 191–197.
- Oldham JM, Martyn JA, Sharma M, Jeanplong F, Kambadur R, et al. (2001) Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280: R1488–R1493.
- Berry C, Thomas M, Langley B, Sharma M, Kambadur R (2002) Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C135–C141. doi:10.1152/ajpcell.00458.2001
- Forbes D, Jackman M, Bishop A, Thomas M, Kambadur R, et al. (2006) Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J Cell Physiol* 206: 264–272. doi:10.1002/jcp.20477

Tableau 6 : Corrélations entre les variables mesurées en vif.

Les coefficients de corrélation de Pearson sont indiqués sous la diagonale et les probabilités associées au-dessus.

	P_NAIS	p140	gmq	pv_fin	age_fin
P_NAIS	-	0.0642	0.4559	0.0008	0.8287
p140	0.24462	-	<.0001	<.0001	<.0001
gmq	0.09983	0.95575	-	<.0001	<.0001
pv_fin	0.42735	0.78768	0.844	-	0.7152
age_fin	0.02903	-0.62594	-0.5004	-0.04896	-

3. Association génotype/phénotype

La race Blonde d'Aquitaine est une race particulière puisqu'elle regroupe plusieurs races bovines du sud-ouest (la Garonnaise, la Quercy et la Blonde des Pyrénées). L'avantage ou l'inconvénient du regroupement de ces trois races du sud-ouest en une seule et même race est qu'il entraîne l'introduction d'une forte variabilité génétique au sein de la race Blonde d'Aquitaine. Néanmoins, comme nous pouvons le voir dans la publication, la mutation $T3811 \rightarrow G3811$ est quasiment fixée chez la Blonde d'Aquitaine. Sur 60 animaux, 50 sont homozygotes mutants, 4 seulement sont hétérozygotes et 6 sont homozygotes sauvages. Ces données suggèrent que la sélection des animaux hypermusclés en race Blonde d'Aquitaine par les éleveurs va dans le sens d'une association entre la présence de la mutation et le phénotype hypermusclé.

À la suite de ces résultats nous avons étendu nos analyses de génotypage dans un contexte génétique différent pour conforter la relation entre le génotype $T3811 \rightarrow G3811$ et le phénotype associé au développement musculaire. Nous avons exploité la disponibilité d'animaux issus d'un schéma de croisements Blonde d'Aquitaine x Prim'Holstein. Ce projet de recherche au sein de l'INRA a été initié dans l'objectif d'identifier la mutation causale du développement musculaire chez la Blonde d'Aquitaine.

Des statistiques d'associations entre le génotype de l'animal et des critères associés à la qualité et la quantité de la viande ont été réalisées par Gilles Renand et son équipe de l'UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative de l'INRA de Jouy-en-Josas. Pour ce faire, ils ont analysé les données de génotypages de 58 animaux (F2 et back-cross) que nous avons effectué en utilisant le test génétique précédemment décrit (cf. Annexe 1 ; Bouyer et al., 2014), et des données concernant ces critères essentiels en sélection bovines.

Avant d'analyser les résultats proprement dits, il convient de tester s'il existe des corrélations entre les variables strictement quantitatives des mesures en vif, ce qui est présenté dans le tableau 6.

Il en ressort que le poids à la naissance est corrélé positivement avec le poids vif final ($p < 1\%$) et marginalement avec le poids à 140 jours ($p = 0.064$). En revanche, le poids à 140 jours est lié surtout au gain moyen quotidien, puis au poids vif final et inversement à l'âge

Tableau 7 : Effectif des génotypes selon les différents facteurs.

A, Effectif des génotypes selon la lignée F2 ou back-cross. B, Effectif des génotypes selon le père. C, Effectif des génotypes selon la date d'abattage.

A.

Effectifs	G/G	G/T	T/T	Total
Lignée CARBC	0	5	8	13
Lignée CARF2	8	25	10	43
Total	8	30	18	56

B.

Effectifs	G/G	G/T	T/T	Total
Père A	4	24	11	39
Père B	2	3	2	7
Père C	2	3	5	10
Total	8	30	18	56

C.

Effectifs	G/G	G/T	T/T	Total
Abattage du 01/03/11	2	12	4	18
Abattage du 08/03/11	3	10	4	17
Abattage du 12/04/11	0	0	4	4
Abattage du 17/05/11	2	5	4	11
Abattage du 07/06/11	1	3	2	6
Total	8	30	18	56

Tableau 8. Résultat du GLM pour la variable P_NAIS.

Facteurs	DDL	F-ratio
C_LIGNEE	1	5.38 *
SEXE	1	18.64 ***
DAT_ABAT	4	4.92 **
N_PERE	2	1.5 NS
genotyp	2	6.37 **

d'abattage final ($p < 0.1\%$ pour ces trois cas). En effet, l'animal est abattu d'autant plus précocement que le poids désiré pour la commercialisation est atteint.

De plus, afin d'éliminer les valeurs extrêmes observées au sein des cinq variables dépendantes strictement quantitatives pour les 58 animaux (P_Nais (poids à la naissance), p140 (poids vif à 140 jours), gmq (gain moyen quotidien), pv_fin (dernier poids vif) et age_fin (âge de la dernière pesée à vif), nous avons réalisé des GLM en utilisant seulement les trois variables explicatives suivantes : les lignées, le sexe et les dates d'abattage. Pour chacune des variables explicatives, nous avons calculé les valeurs moyennes et leurs dispersions correspondant aux catégories des facteurs significativement associés. Les individus se démarquant trop des valeurs prédites pour au moins une catégorie sont considérés comme extrêmes. Ainsi, deux animaux issus de la génération F2 ont été éliminés de l'étude, ce qui porte à 56 l'effectif des animaux considérés. Les données de génotypage et la variable prenant en compte le père ont ensuite été ajoutées à l'analyse.

Afin d'avoir une vue d'ensemble de la représentativité de chacun des allèles selon les facteurs, les effectifs des génotypes ont été répartis selon la lignée, le père et la date d'abattage dans le tableau 7.

Il est intéressant de noter les ségrégations alléliques obtenues en génération F2 et back-cross. En effet, une ségrégation Mendélienne prédit en génération F2, $\frac{1}{4}$ de G/G , $\frac{1}{4}$ de T/T et $\frac{1}{2}$ de G/T et en génération Back cross, $\frac{1}{2}$ de T/T et $\frac{1}{2}$ de G/T . La répartition allélique en F2 avec $\frac{1}{4}$ de G/G (8 animaux), $\frac{1}{4}$ de T/T (10 animaux) et $\frac{1}{2}$ de G/T (25 animaux) et la répartition allélique en back-cross avec $\frac{1}{2}$ de T/T (8 animaux) et $\frac{1}{2}$ de G/T (5 animaux), nous montre bien que cet allèle ségrége de manière Mendélienne (Tableau 7A).

Compte tenu des éléments précédents, les études d'association ont porté sur 56 animaux. Parmi les cinq facteurs considérés, la part du facteur génotype dans la variation de chacune des 25 variables peut être déduite du modèle GLM. À titre d'exemple, la variable « Poids à la naissance (P_NAIS) » est influencée surtout par le sexe à l'avantage du mâle, par la date d'abattage (les plus gros seront abattus plus tôt), le génotype (voir analyse détaillée ci-dessous) et enfin la lignée. Le père quant à lui n'intervient pas (tableau 8).

De manière plus générale, les résultats correspondants aux 24 autres variables sont consignés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats des GLM sur 24 variables quantitatives

F : F-ratio entre les variances inter et intra-variable.

Facteurs	DDL	F (Coul_C)	F (gmaq)	F (p140)	F (age_fin)	F (pv-fin)	F (arri_v)	F (dess_v)	F (epau_v)
Lignée	1	0.50 NS	0.07 NS	2.45 NS	0.20 NS	0.55 NS	7.45 **	11.98 **	8.68 **
Sexe	1	0.00 NS	2.44 NS	7.70 **	5.66 *	2.64 NS	0.80 NS	6.01 *	0.23 NS
Date Abat.	4	0.31 NS	7.74 ***	10.40 ***	17.35 ***	7.64 ***	3.34 *	5.69 ***	2.30 NS
Père	2	0.03 NS	0.88 NS	0.90 NS	3.46 *	1.14 NS	1.12 NS	0.16 NS	0.91 NS
Génotype	2	7.16 **	1.33 NS	1.83 NS	2.45 NS	0.37 NS	27.66 ***	35.17 ***	24.74 ***

Facteurs	DDL	F (synt_v)	F (etat_v)	F (cuir_v)	F (vent_v)	F (os_v)	F (rdt_c)	F (p_carc)	F (LTDG)
Lignée	1	13.59 ***	8.74 **	0.03 NS	0.83 NS	0.26 NS	2.52 NS	0.06 NS	1.62 NS
Sexe	1	0.00 NS	15.42 ***	15.57 ***	0.34 NS	6.36 *	7.20 *	5.11 *	0.84 NS
Date Abat.	4	4.57**	1.06 NS	1.64 NS	1.14 NS	3.30 *	20.86 ***	4.53 **	6.41 ***
Père	2	0.25 NS	0.67 NS	0.93 NS	1.15 NS	0.87 NS	0.41 NS	1.31 NS	0.65 NS
Génotype	2	34.83***	8.74 ***	11.24 ***	3.93 *	6.98 **	62.03 ***	4.47 *	3.93 *

Facteurs	DDL	F (JSDG)	F (CUDG)	F (arri_c)	F (dess_c)	F (epau_c)	F (synt_c)	F (n_couv)	F (n_intr)
Lignée	1	0.75 NS	0.05 NS	5.55 *	6.23 *	12.87 ***	10.20 **	0.29 NS	0.15 NS
Sexe	1	7.95 **	0.01 NS	0.18 NS	0.39 NS	0.10 NS	0.03 NS	13.54 ***	7.03 *
Date Abat.	4	4.76 **	3.13 *	2.65 *	3.67 *	1.68 NS	2.95 *	1.66 NS	2.69 *
Père	2	1.06 NS	1.82 NS	0.08 NS	0.02 NS	0.56 NS	0.15 NS	2.82 NS	1.65 NS
Génotype	2	0.99 NS	23.88 ***	43.76 ***	27.79 ***	18.73 ***	31.08 ***	6.13 **	3.03 *

L'effet lignée se manifeste pour plusieurs paramètres, mais surtout sur les notes de pointage « synthétique muscularité à vif » et « épaule sur carcasse », et dans une moindre mesure sur les notes de pointage « dessus à vif » et « synthétique muscularité sur carcasse » (Tableau 9). L'effet du sexe s'exprime principalement sur le poids à la naissance, la note d'état à vif, la finesse du cuir à vif et la note de pointage du gras de couverture sur carcasse. La date d'abattage se traduit surtout sur le rendement en carcasse, l'âge de dernière pesée à vif, et le poids à 140 jours. Le père a une influence significative mais de manière peu prononcée sur l'âge de dernière pesée à vif (Tableau 9).

Le génotype a un impact significatif ($p < 5\%$) sur la plupart des variables dépendantes étudiées sauf sur le gain moyen quotidien, le poids vif à 140 jours, l'âge de dernière pesée en vif, le dernier poids vif et la longueur de cuisse (Tableau 10). Pour les vingt variables influencées par le génotype, il convient de préciser les valeurs moyennes associées à chacun des trois génotypes. Dans tous les cas sauf pour la variable mesurant la finesse des os canons, les individus hétérozygotes montrent une mesure intermédiaire entre celles des deux homozygotes.

En résumé, trois variables liées à la quantité de gras (etat_v : note d'état, n_couv : pointage gras couverture et n_intr : pointage gras interne) ont leurs valeurs les plus fortes chez les animaux de génotype *T/T* (Tableau 10). Ces résultats sont en accord avec les données de gras des animaux hypermusclés. En effet, ces animaux hypermusclés présentent une diminution de leur masse grasse et du dépôt de gras sous-cutanée (Bailey et al., 1982). Il n'est donc pas étonnant d'obtenir des mesures plus fortes chez des animaux de génotype *T/T* par rapport aux animaux de génotype *G/G* concernant la quantité de gras. De plus, la variable concernant la couleur de la viande est également influencée par le génotype dans la mesure où la viande la plus foncée se trouve chez les individus *T/T*. Ces résultats sont en accord avec les observations faites dans les années 80 par Ménissier qui indiquait une viande plus pâle produite par les animaux hypermusclés (Ménissier, 1982a). Enfin, on observe les valeurs les plus fortes pour la variable LTGD (longueur de carcasse) chez les individus *T/T* (Tableau 10).

Pour le reste des variables significativement influencées par le génotype, ce sont les individus *G/G* qui ont les valeurs supérieures. A titre d'exemple, les variables correspondant à la finesse du cuir, à la finesse de l'os canon et à la rétractation du ventre sont significativement affectés par la mutation *G3811*. On note que les animaux *G/G* possèdent un cuir plus fin, un os canon également plus fin ainsi qu'un ventre plus rétracté. La finesse du cuir supérieure chez les

Tableau 10. Valeurs moyennes des variables pour chacun des génotypes.

Variable dépendante	Moyenne G/G	Moyenne G/T	Moyenne T/T	P-value	Effets additifs	P-value	Dominance	P-value
COUL_C	2,54± 0,30	2,92±0,19	3,71±0,19	0,0020	-0,78	0,0015	-0,27	0,36
CUDG	224,56±3,27	206,66±2,14	198,27±2,04	<0,0001	1,20	<0,0001	-0,44	0,05
LTDG	1006,38±11,75	1038,34±7,70	1041,29±7,35	0,0267	-0,62	0,01	0,52	0,10
P_NAIS	48,93±1,44	46,33±0,94	43,18±0,90	0,0037	0,77	0,0013	0,07	0,80
arri_c	10,85±0,47	7,25±0,31	5,77±0,29	<0,0001	1,41	<0,0001	-0,59	0,0033
arri_v	9,96±0,42	7,49±0,28	6,29±0,27	<0,0001	1,27	<0,0001	-0,44	0,05
cuir_v	12,36±0,78	9,03±0,51	8,24±0,49	0,0001	0,95	<0,0001	-0,59	0,03
dess_c	9,79±0,50	6,60±0,33	5,51±0,31	<0,0001	1,29	<0,0001	-0,63	0,0063
dess_v	9,34±0,37	6,99±0,24	5,67±0,23	<0,0001	1,37	<0,0001	-0,40	0,06
epau_c	9,46±0,49	6,96±0,32	5,98±0,31	<0,0001	1,17	<0,0001	-0,51	0,039
epau_v	9,10±0,41	6,78±0,27	5,77±0,26	<0,0001	1,26	<0,0001	-0,50	0,0328
etat_v	5,10±0,64	6,32±0,42	8,05±0,40	0,0006	-0,88	0,0003	-0,15	0,59
n_couv	5,59±0,65	7,45±0,43	8,23±0,41	0,0044	-0,79	0,0011	0,32	0,27
n_intr	6,21±0,69	7,70±0,45	8,13±0,43	0,0580	-0,58	0,02	0,32	0,29
os_v	8,83±0,43	7,23±0,28	7,26±0,27	0,0023	0,73	0,0028	-0,75	0,01
p_carc	141,28±4,27	132,74±2,80	126,43±2,67	0,0169	0,69	0,0047	-0,10	0,72
rdt_c	67,64±0,60	62,02±0,40	59,88±0,38	<0,0001	1,46	<0,0001	-0,66	0,0003
synt_c	9,95±0,46	6,99±0,30	5,78±0,28	<0,0001	1,32	<0,0001	-0,55	0,012
synt_v	9,52±0,37	7,07±0,24	5,94±0,23	<0,0001	1,36	<0,0001	-0,51	0,02
vent_v	7,03±0,50	5,69±0,33	5,48±0,32	0,03	0,62	0,01	-0,45	0,13

animaux *G/G* pourrait être expliquée par une teneur inférieure en collagène chez les animaux hypermusclés (Bailey et al., 1982). La finesse de l'os canon chez les animaux *G/G* pourrait être expliquée par le gradient inversement proportionnelle observé chez les animaux hypermusclés entre la proportion de muscle et la finesse du squelette (Ménissier, 1982a). Enfin, la rétractation du ventre, supérieure chez les animaux *G/G*, pourrait être expliquée par une proportion de muscle plus importante.

Ces analyses confirment donc une association entre la présence de la mutation *G3811* de la race Blonde d'Aquitaine avec le phénotype d'hypertrophie musculaire et les caractéristiques qui lui sont habituellement associés.

4. Conclusion

Nous avons entrepris une analyse fine de la structure primaire de l'ARNm du gène *myostatine* chez la race Blonde d'Aquitaine. Ce travail nous conduit *in fine* à l'identification d'un allèle atypique du locus *mh* (*muscle hypertrophy*) en l'occurrence une substitution *T3811* → *G3811* au niveau de l'intron 2. La substitution engendre un nouveau site donneur d'épissage qui « impose » au spliceosome l'inclusion d'un exon supplémentaire de 41-pb. Cet exon supplémentaire entre l'exon 2 et l'exon 3 engendre deux codons STOP prématurés. La traduction d'un tel transcrite prédit la production d'une myostatine tronquée de la totalité de sa partie bioactive codé par l'exon 3. Elle serait donc non fonctionnelle. Par ailleurs, ce transcrite aberrant est bien représenté et semble relativement stable. En plus, il est à noter que la mutation est dite *leaky* : les animaux homozygotes *G3811/G3811*, produisent également le transcrite sauvage, certes à un niveau résiduel par rapport au transcrite aberrant. Ainsi, nous avons découvert l'allèle *mh* à l'origine, non seulement de la conformation musculaire chez la race Blonde d'Aquitaine actuelle, mais probablement aussi de la tendreté de sa viande.

La tendreté et le « persillage » (flaveur et propriétés organoleptiques) de la viande bovine représentent une préoccupation majeure des filières bovines. Ces deux qualités sensorielles de la viande ont, de tout temps, joué un rôle fondamental dans la satisfaction du consommateur. Aujourd'hui, il est bien établi que les bovins culards (présentant une hypertrophie musculaire) se caractérisent par un fort développement musculaire associé à une meilleure tendreté de la viande. Néanmoins, cette première qualité, certes économiquement rentable, est défavorable

pour la flaveur de la viande. En effet, le caractère culard se développe au détriment des dépôts adipeux intramusculaires et donc de la flaveur de la viande. Par ailleurs, ces deux qualités recherchées par la filière bovine et le consommateur présentent une forte variabilité non maîtrisée inter- et surtout intra-races. C'est le cas notamment de la race Blonde d'Aquitaine.

II. Variabilité phénotypique du développement musculaire chez la race Blonde d'Aquitaine

Le constat relaté ci-dessus suggère qu'en plus de la mutation découverte, des allèles d'autres gènes modificateurs seraient impliqués dans la définition de la variabilité quantitative et qualitative du développement musculaire chez la race Blonde d'Aquitaine actuelle.

Récemment, une démarche raisonnée a été entreprise par l'équipe de Michel Georges (Druet et al., 2014) pour comprendre l'évolution du développement musculaire extrême qui caractérise la race Blanc Bleu Belge actuelle. Ces travaux suggèrent que la masse musculaire chez les bovins de boucherie (comme d'autres caractères de production dans la sélection directionnelle), semble être contrôlée par (i) un ensemble d'allèles récents avec un effet majeur qui se propage rapidement à travers la population, et (ii) un grand nombre de variants sans doute plus anciens avec des effets mineurs qui s'installent lentement dans la population (adaptation polygénique). Nous pensons que ces combinaisons alléliques doivent « composer » avec les caractéristiques intrinsèques des allèles *mh* découverts pour définir le développement musculaire des races bovines.

D'autres travaux relatifs au déterminisme génétique du taux de lipides intramusculaires (persillage) ont été entrepris à la demande de la profession. En effet, la valeur économique des carcasses bovines dépend notamment de la masse des tissus musculaires relativement à la masse des tissus adipeux. En particulier, les tissus adipeux inter- et intra-musculaires participent, avec les myofibres, le tissu conjonctif et plus largement la matrice extracellulaire, à la qualité sensorielle et nutritionnelle de la viande. Par ailleurs, il est bien établi que les développements musculaires et adipeux sont étroitement liés : l'hypertrophie musculaire se développe au détriment du tissu adipeux.

Chez le bovin, il existe une très grande variabilité de la teneur en lipides intramusculaires et la préoccupation majeure de la profession est de savoir comment augmenter à défaut de maîtriser les teneurs en lipides intramusculaires chez les animaux des races allaitantes plutôt maigres comme la Blonde d'Aquitaine, la Limousine et surtout la Blanc Bleu Belge, dont la viande n'a pas assez de goût pour satisfaire les consommateurs.

À ce stade de l'avancement de nos travaux, mais aussi des données bibliographiques actuelles, il serait hasardeux de cibler un ou plusieurs gènes candidats afin d'identifier une combinaison allélique pour expliquer la variabilité phénotypique du développement musculaire chez le bovin et la Blonde d'Aquitaine en particulier.

Le gène *myostatine* est sujet à une régulation fine qui contrôle la performance de son ARNm et donc la quantité de myostatine active produite. Il est régulé au niveau transcriptionnel par plusieurs éléments en *cis* au niveau de son promoteur, est la cible de divers facteurs agissant en *trans* comme les protéines des familles FoxO, SMAD et MRF en plus d'être la cible d'une rétroinhibition par la myostatine elle-même *via* SMAD7. Au niveau post-transcriptionnelle, il est assez bien établi que les transcrits *myostatine* sont contrôlés par des miRNA musculaires. Enfin, au niveau post-translationnelle, la myostatine subit une maturation assez élaborée pour produire une partie mature bioactive et un propeptide qui contrôle l'activité physiologique de la myostatine (cf. Introduction Bibliographique. II. 3. b) et c)). Par ailleurs, plusieurs épissages alternatifs ont été décrits chez différentes espèces y compris *Bos taurus* (cf. II. 2. b). Certains d'entre eux, qui engendrent une protéine tronquée de sa partie bioactive, semblent avoir un rôle physiologique puisqu'ils permettraient une régulation négative de la myostatine.

Par ailleurs, il est bien établi que les mutations du gène *myostatine*, qui engendrent sa sous-expression, ou celles qui altèrent la fonction de son produit, conduisent à une hypertrophie musculaire et une réduction du tissu adipeux intra-musculaire. À l'inverse, une surproduction de la myostatine conduit à une atrophie musculaire et un enrichissement en tissu adipeux. Enfin, l'action de la myostatine sur le développement musculaire est dose-dépendante.

La suite de nos travaux a consisté en l'étude du gène *myostatine* avec une attention particulière portée sur l'allèle que nous avons découvert. En effet, nous pensons que l'approfondissement de l'étude de cet allèle pourrait nous amener à des cibles potentielles qui expliqueraient la variabilité phénotypique du développement et de la qualité du muscle chez la race bovine Blonde d'Aquitaine en particulier.

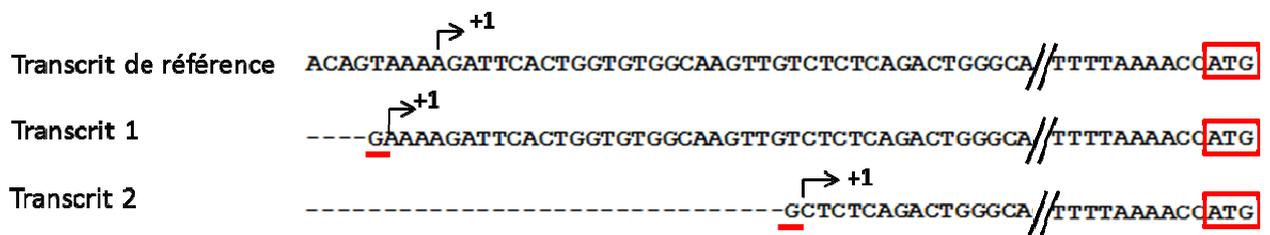


Figure 33 : Des régions 5'UTR de tailles variables.

Le codon d'initiation de la traduction est encadré en rouge. La guanine correspondant à la coiffe est soulignée en rouge. Le site +1 d'initiation de la transcription est indiqué par une flèche.

1. Analyse des séquences 5' et 3' non codantes du transcrit du gène *myostatine*

Les analyses relatives à l'expression de l'allèle du gène *myostatine* que nous avons effectuées (Bouyer et al 2014) chez la race Blonde d'Aquitaine révèlent une expression variable entre les animaux. Cette variabilité serait inhérente à une activité promotrice propre à l'individu *via* des variants agissants en *cis* et/ou en *trans*. Dans une première approche, nous avons entrepris l'étude des régions non traduites des transcrits du gène *myostatine*. Un fonctionnement, même subtil du promoteur, pourrait se traduire par des sites différents de l'initiation de la transcription. Par ailleurs, et bien que les régions 5' et 3' UTR (*Untranslated region*) du transcrit du gène *myostatine* chez le bovin ont été analysées et publiées (Jeanplong et al., 2001), nous avons néanmoins décidé de réaliser le même travail. En effet, de part l'importance de ces régions dans la traduction des ARNm, et donc dans la quantité de myostatine produite dans notre cas, il nous a semblé judicieux de confirmer les données sinon les actualiser dans le cas de la race Blonde d'Aquitaine.

a) Analyse de la région 5'UTR

À partir des échantillons de muscles (*longissimus dorsi*) de deux animaux de race Blonde d'Aquitaine de génotype *G3811/G3811* et un animal croisé Blonde d'Aquitaine x Holstein de génotype *T3811/T3811*, de génération backcross, nous avons réalisé une RACE (*Rapid Amplification of cDNA end*) afin d'obtenir la structure primaire de la région 5'UTR.

La figure 33 récapitule les données obtenues. Nous avons mis en évidence deux nouveaux sites potentiels d'initiation de la transcription. La présence d'une guanine à l'extrémité 5' de chacun de ces transcrits qui est en temps normal présente pour constituer la coiffe du transcrit et qui n'est pas présente dans la séquence d'ADN de référence nous conforte dans l'idée que ces transcrits existent et qu'il ne s'agit pas d'erreurs de manipulation.

L'animal croisé présente les transcrits 1 et 2. Ce dernier est également présent chez un des deux animaux de race Blonde d'Aquitaine alors que l'autre animal de race Blonde d'Aquitaine exprime le transcrit de référence.

Ainsi, nous avons identifié deux autres sites d'initiation de la transcription pour le gène *myostatine* chez le bovin. La représentativité de ces isoformes et leur impact éventuel sur la

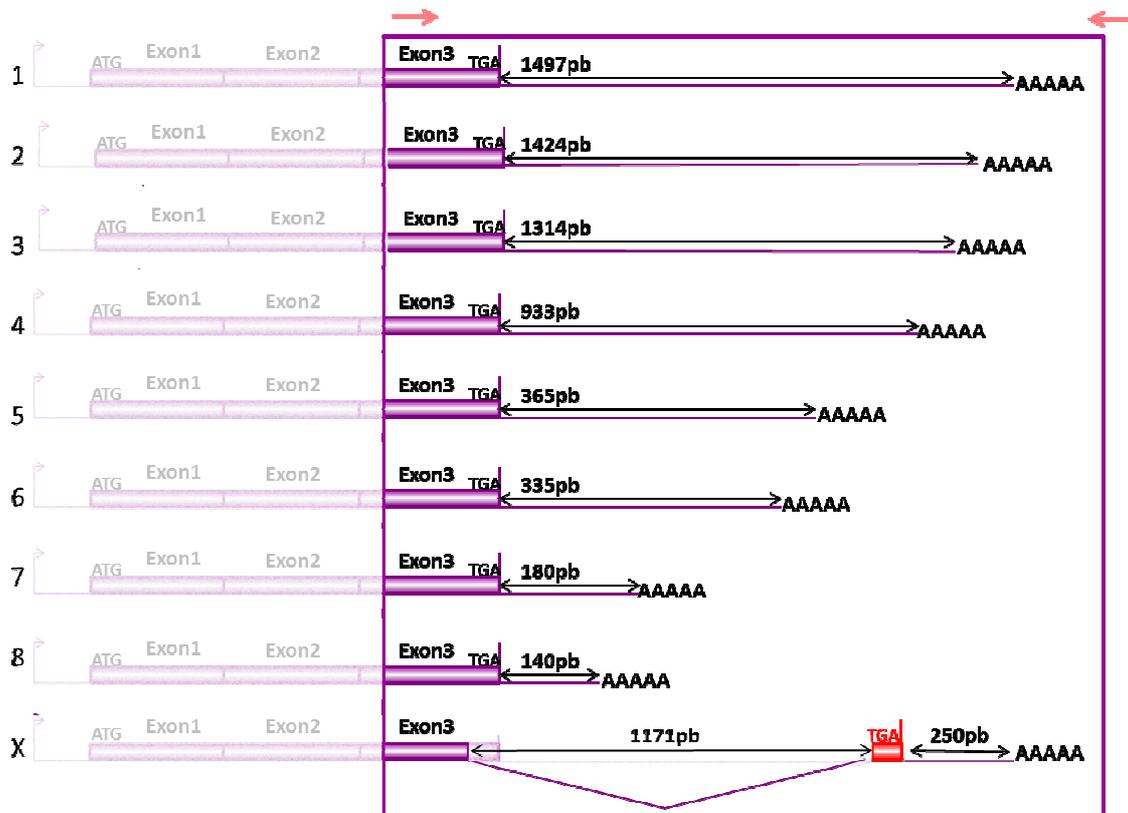


Figure 34 : Des régions 3'UTR de tailles variables.

Tableau 11 : Présence ou absence des transcrits avec des 3'UTR de tailles variables chez les animaux étudiés.

Nom du transcrit	Longueur séquence 3'UTR (pb)	Echantillons de race Blonde d'Aquitaine	Echantillons de race Limousine	Echantillons d'animaux issus du croisement Blonde x Prim'Holstein	Référence (Jeanplong et al., 2001)
1	1497	présent	présent	-	présent
2	1424	-	-	présent	présent
3	1314	présent	présent	-	présent
4	933	présent	-	-	-
5	365	présent	présent	-	-
6	335	présent	présent	présent	-
7	180	présent	présent	-	-
8	140	présent	présent	-	-
X	250	-	-	présent	-

traduction reste à analyser. Par ailleurs, ces données préliminaires dénotent une certaine variabilité de l'activité du promoteur qui pourrait contribuer à la variabilité d'expression observée entre les animaux de race Blonde d'Aquitaine (Bouyer et al., 2014).

b) Analyse de la région 3'UTR

À partir d'échantillons du même muscle (*longissimus dorsi*) provenant des deux mêmes animaux de races Blonde d'Aquitaine, du même animal croisé et en plus d'un animal de race Limousine, nous avons réalisé une RACE afin d'identifier la structure primaire de la région 3'UTR.

La figure 34 illustrent les différents 3'UTR obtenus et leur présence ou absence selon l'animal est présentée tableau 11.

Le transcrit 1 et le transcrit 3 sont retrouvés chez les animaux de race Blonde d'Aquitaine et Limousine et le transcrit 2 chez l'animal croisé. Ces transcrits ont été précédemment décrits par l'équipe de Jeanplong (Jeanplong et al., 2001).

Le transcrit 4 a été identifié uniquement à partir de l'échantillon provenant des deux animaux de race Blonde d'Aquitaine. Les transcrits 5 à 8 ont été mis en évidence à partir des échantillons provenant des deux animaux de race Blonde d'Aquitaine et de l'animal de race Limousine.

Le transcrit 6 est également retrouvé dans l'échantillon provenant de l'animal croisé.

L'ensemble de ces transcrits diffèrent par la taille de leur région 3'UTR respective probablement sans changement du cadre de lecture ouvert. En revanche, le transcrit x, observé chez l'animal croisé, se caractérise par l'absence de la fin du dernier exon incluant le codon STOP légitime et une large partie de la région 3'UTR. Ce transcrit avec un nouveau codon STOP prédit une protéine avec la région bioactive modifiée (Fig. 34 et 35).

2. Identification de transcrits alternatifs

L'épissage alternatif des pré-ARNms engendre des transcrits différents susceptibles de produire des protéines de fonction distincte de celle du produit du gène. Chez le mouton, Jeanplong et al. ont décrit pour la première fois un transcrit alternatif du pré-ARNm du gène *myostatine*. Ils ont également décrit un transcrit similaire chez le bovin (Jeanplong et al. 2013).



Figure 35 : Séquence du transcrit x à partir de la fin de l'exon 3 jusqu'à sa queue poly(A).

La délétion présente dans le transcrit x débute à la fin de la première séquence duppliée. Elle englobe la fin de l'exon 3 et une grande partie de la séquence 3'UTR de référence. Le TGA initial n'est plus présent, un nouveau TGA suit dans le cadre de lecture.



Figure 36 : Isoformes de la myostatine.

A, Amplification PCR (encadré violet) de la séquence codante dans sa totalité (amorces : flèches rouge). **B**, Transcrit sauvage, transcrits alternatifs et transcrit BAB. **C**, Séquence peptidique prédites à partir de ces transcrits alternatifs. Les transcrits 1 et 2 ont une partie exonique commune qui prédit une la même séquence peptidique (surligné en rouge), sauf au niveau de la séquence correspondant à une partie de l'exon 3 du transcrit 2 (surligné en bleu). BAB : *Blonde d'Aquitaine Breed*.

Nous n'avons pas détecté ce transcrit chez la Blonde d'Aquitaine. Une des explications plausibles serait que la forte représentativité du transcrit aberrant de l'allèle du gène *myostatine* en race Blonde d'Aquitaine (Bouyer et al., 2014) empêche l'amplification PCR du transcrit alternatif décrit par Jeanplong et al. Aussi, nous avons utilisé un échantillon musculaire (*longissimus dorsi*) d'un animal issu du croisement Blonde d'Aquitaine x Prim'Holstein, de génotype sauvage $T3811 \rightarrow T3811$. Après avoir rétrotranscrit les ARN en ADNc, nous avons amplifié la séquence codante de la myostatine par PCR avec les mêmes amorces (Fig. 36) précédemment utilisées pour amplifier le cadre de lecture ouvert de la myostatine chez la Blonde d'Aquitaine (Bouyer et al. 2014). Les produits d'amplification PCR (Fig. 36A) ont été clonés et plusieurs clones recombinants ont été séquencés (cf. Annexe 2). L'analyse des séquences révèle deux isoformes du transcrit du gène *myostatine* en plus du transcrit canonique (Fig. 36B). La figure 36 présente également le transcrit aberrant que nous avons identifié chez la Blonde d'Aquitaine. Il est à noter que les transcrits 1 et 2 possèdent les sites d'épissage légitimes pour produire le transcrit canonique. Néanmoins, le transcrit 1 résulte de l'usage d'un site accepteur de l'épissage situé dans la région 3'UTR. Le transcrit 2, le même que celui décrit par l'équipe de Jeanplong (Jeanplong et al., 2013), résulte de l'usage de sites accepteurs et donneurs de l'épissage situés au début de l'exon 3 et le même site accepteur utilisé pour le transcrit 1 et qui est situé dans la région 3'UTR. Les trois transcrits partagent les mêmes exons 1 et 2. La protéine prédite par le transcrit 2 joue un rôle dans la régulation de l'activité physiologique de la myostatine (Jeanplong et al., 2013).

L'ensemble de ces données, qui restent néanmoins préliminaires, nous suggèrent que les différents isoformes d'ARNm du gène *myostatine* pourraient jouer un rôle dans l'activité effective de la myostatine qui, à son tour, contribuerait à la variabilité phénotypique observée chez le bovin et notamment en race Blonde d'Aquitaine. Nous sommes conscients que seule une analyse fonctionnelle de ces différents isoformes d'ARNm pourrait apporter des éléments de réponses relatives à leurs rôles physiologiques. Aussi, nous avons entrepris une analyse fonctionnelle des différentes régions 3'UTR identifiées.

TGAGGTCTATATTTGGTTCATAGCTTCCTCAAACATGGAAGGTCTTCCCCTCAACAATTTTGAAACTGTGAA
 ATTATCTACCACAGGCTATAAGCCTAGAGTATGCTACAGTCACTTAAGCACAAGCTACAGTATATGAGCT ←1
AAAAAGAGAGAATATATGCAATGGTTGGCATTTAACCATCC ←2 AAACAAATCGTATAATAAAAAGTTTTATG
 ATTTCCAGAGTTTTTGAAGTAGGAGATCAAATTCATTTATGTTGAAATATATTACAACACATGCAGGTG
 AATGAAAGCAATTCTCCTTGTCTTCTGGTGA ←3 AATTAAAGGAGTATGCTTTAAAAATCTATTTCTCTACAGTT
TCACTTAATATTTTAC ←4 AGAAAAATCTATATGTAGTATTGGTAAAAATGCAGTATTGTTATATAACCATTATTT
 GAAACATCCTTAAACACTTGAATTTATATTGTATGATAGCATACTTGGTAAGATGAGATTCCACAAAGTA
 GGGATGGCACACCATAACGCAGGTTACCATTCTATACTGATTGATACAGTACATTAACAGTTTTTGGCAA
 TGGTGCTAATACAATAGGCTGAATGGCTGATGTTATCAGGTTTATCAAGCAAAAAACATTCAGGAAAGTA
 ATAAGTTTCTCCTTTCTCAGGTGCATTTTCACACTCCTCCCTATGGGCAATGGATGTTCTATAGAGAAA
 GAAAATCATTTTCTAGAGGTCTACATTCAATTCTGTAGCATACTTGGAGAAGCTGCATTGAAAAGGCA
 GTCAAAAAGTATTCATTTTGGTCAAAATTTCAAAATTATAGCCTGCCTTTGCAATACTGCAGCTTTTAGG
 ATGAAATAATGGAAATGACTGATTCTATCAATATTGTATAAAAAGATTTTGAAATAGTTGCATTTATATA
 ATATGTATACAATATTTGTTTGT ←5 AAATAAATGTCTCCTTTTTTATTTACTTGGTATATTTTTACAGTAAG
 GACATTTCAAATTAAGTATTAAGGCACAAGACATGTCATGTAGGACATAAAAGCAAAGCTTATATTTT
 GGAGCAAATTAGTTGATTAATAGTGGTCTTAAAACTCCATATGCTAATGGTTAGATGGTTATATTACAA
 TCATTTTATATTTTTTTTACATTATTAGCATTCACTTATGATTTCATGATGGCTGTATAATGTGAATGTGA
 AATTTCAATGGTTTACTGTCATTGTATTCAAATCTCAACGTTCCATTATTTTAACTTATAAATATTTAA
 GCATACCAAATGATTTAACTCTATTATCTGAAATCAGAATAATAAACTGATGATATCTT ←6. ←7 TACAAATTGTT
 AATTTTATTTTATAATTTGATAATGAATATATTTCTGCATATATTTACTACTATTTTGTAAATCAGGATT
 ←8. ←9 TTGTTAATCAAATAAATGAACTTATGATTAAAGTGAATTATTTCTTACATCCAATGTGTAGAAACAATT
 ←10 TAAGTTATATTAAAGTGTTTTCACCTTTTTTGAAGA ←11

Figure 37 : Séquences 3'UTR utilisés pour l'étude fonctionnelle.

11 séquences ont été amplifiées pour insertion dans le plasmide d'intérêt. L'amorce sens (flèche) d'amplification est commune (surlignée en vert) et débute juste à la suite du codon STOP TGA de référence. Les amorces antisens (flèche) sont surlignées en bleu. Les queues poly(A) des différents 3'UTR identifiés débutent juste après les nucléotides soulignés.

3. Étude fonctionnelle des différentes régions 3'UTR

L'impact potentiel des différentes régions 3'UTR sur l'efficacité de traduction et donc la quantité de myostatine produite, à été approchée indirectement en introduisant les régions 3'UTR en aval du cadre de lecture ouvert codant la luciférase (Fig. 37). Nous avons testé l'ensemble des séquences 3'UTR obtenus en plus de trois autres séquences (Fig. 37). Les différentes séquences 3'UTR étudiées sont répertoriées sur la séquence de référence figure 37.

Les régions d'intérêts ont été amplifiées par PCR en utilisant des couples d'amorces appropriés (Tableau 5) comportant des sites de restriction *Sall* et *XbaI* pour une ligature au sein du vecteur *PmiR-glo Dual-Luciferase Target Expression Vector* (Fig. 30). À la suite de ces différentes constructions, nous avons transfectés des cellules myoblastiques de souris (lignée C2C12). L'efficacité de traduction est évaluée indirectement *via* le dosage de l'activité luciférase. Le plasmide *PmiR-glo* (Fig. 30) a la particularité de contenir deux unités transcriptionnelles, l'une afin d'exprimer le gène *firefly luciferase (luc2)* et l'autre permet d'exprimer le gène de la *Renilla luciférase (hRluc)* qui servira de contrôle interne de luminescence.

L'impact éventuel des différentes régions 3'UTR sur l'activité luciférase a été abordé dans un premier temps en conservant la séquence de terminaison de la transcription (*SV40 late poly(A)*) du vecteur. Dans ce premier cas, nous évaluerons l'impact des séquences *3'UTR/SV40 late poly(A)*. Dans un deuxième temps, nous avons réitéré l'expérience en éliminant la séquence *SV40 late poly(A)* du vecteur, ce qui nous permet d'évaluer l'impact des seules régions 3'UTR (Fig. 30).

a) Etude de l'activité Luciférase : Impact des 3'UTR/ SV40 late poly(A)

L'activité de la luciférase est mesurée 48h à la suite des transfections des cellules C2C12 par les 11 plasmides recombinants qui diffèrent par la région 3'UTR (Fig. 38) insérée entre la séquence codant la luciférase et la séquence correspondant au *SV40 late poly(A)*.

Au cours de l'analyse de la luminescence, deux mesures sont effectuées : l'une mesure la luminescence produite par la Firefly luciférase et l'autre par la Renilla luciférase. Le taux d'activité relative de la luciférase est calculé en retranchant les mesures obtenues par les contrôles négatifs et en faisant le ratio des mesures Firefly/Renilla.

% d'activité luciférase par rapport au vecteur natif

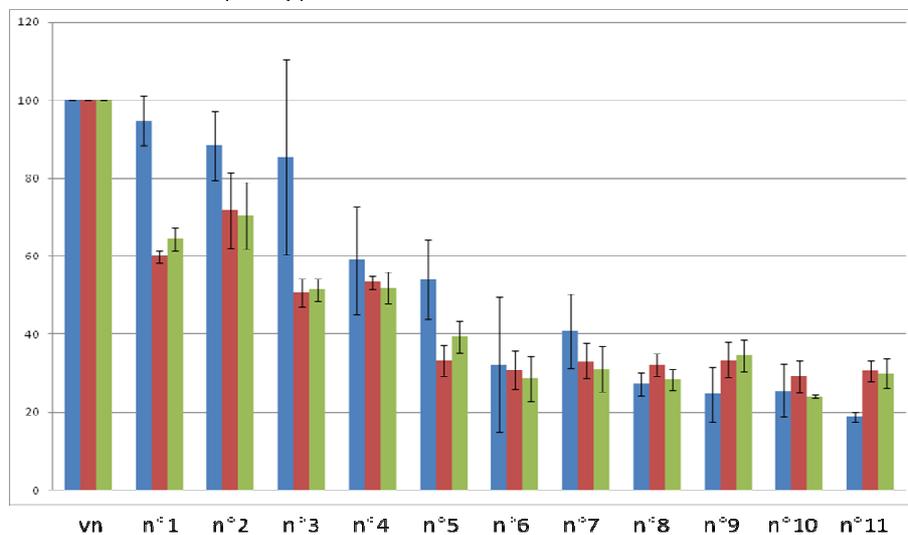


Figure 38 : Impact des séquences 3'UTR/ SV40 poly(A) sur le taux d'activité luciférase.

Taux d'activité luciférase dans les cellules C2C12, mesurée après transfection des 11 constructions plasmidiques contenant la séquence signal poly(A) SV40, et rapportée au taux d'activité après transfection du vecteur natif.

% d'activité luciférase par rapport au vecteur natif

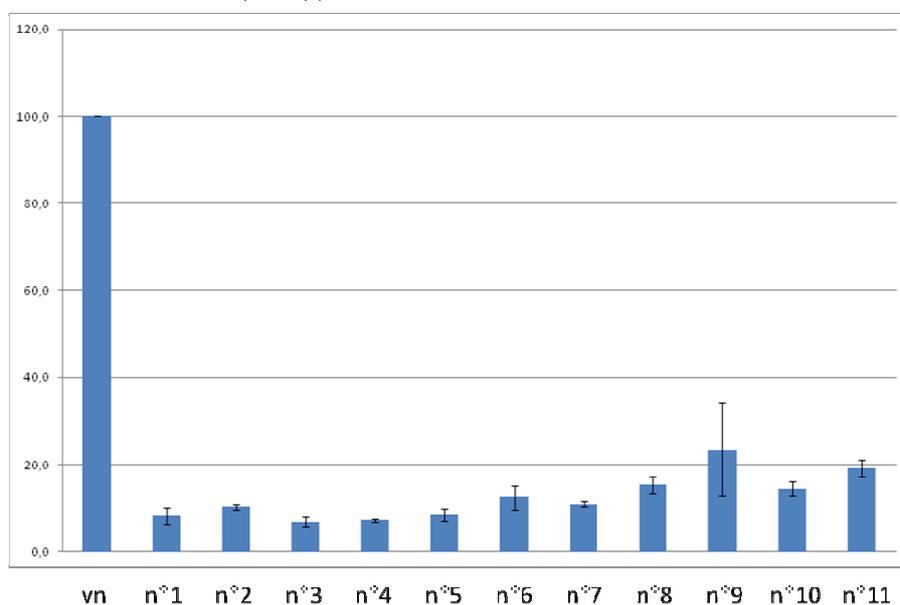


Figure 39 : Impact des séquences 3'UTR seules.

Taux d'activité luciférase de cellules C2C12 mesurée après transfection des 11 constructions plasmidique ne possédant pas la séquence signal poly(A) SV40, et rapportée au taux d'activité après transfection du vecteur natif.

Nous avons réalisé ces mesures en triplicats techniques et biologiques. Les résultats d'activité luciférase selon la construction plasmidique ont été rapportés au pourcentage de l'activité de la luciférase obtenue avec le vecteur natif et sont présentés figure 38.

Sur une base 100 du taux d'expression de la luciférase à partir du vecteur PmiR-glo natif, on observe une similarité des résultats entre les triplicats biologiques. Bien que les 1^{ers} résultats obtenus (bleu) présentent de larges écarts types, les 2nd et 3^{ème} résultats obtenus (rouge et vert) ont des profils équivalents avec de plus faibles écarts types. On observe ici une diminution de l'expression de la luciférase inversement proportionnelle à la longueur de la séquence 3'UTR insérée dans le plasmide.

À la suite de ces résultats, nous avons extrait les ARN totaux des cellules transfectées avec ces plasmides contenant des séquences 3'UTR de tailles variables. Nous les avons traités pour la 3'RACE et déterminé la structure primaire de chacun de ces 3'UTR. L'objectif était de savoir si les différents 3'UTR utilisent leurs propres signaux de terminaison ou la même séquence de terminaison *SV40 late poly(A)* du vecteur.

Les résultats obtenus montrent sans ambiguïté que tous les 3'UTR étudiés se terminent par les mêmes séquences de terminaison, celle de la séquence de polyadénylation *SV40 late poly(A)* du vecteur et non pas par leur propre séquence de terminaison identifiée chez le bovin. On assiste ici à un effet de terminaison « dominant » de la séquence *SV40 late poly(A)*. Pour palier à cet effet, nous avons éliminé la séquence *SV40 late poly(A)* comme indiqué figure 30, tout en conservant les différentes régions 3'UTR insérées dans le vecteur.

b) Impact des 3'UTR seuls

Nous avons réalisé les transfections avec les 11 vecteurs recombinants (chacun avec un type de 3'UTR) sans *SV40 late poly(A)*. Ces transfections ont été réalisées en plaque 48 puits en triplicats techniques mais pas en triplicats biologiques. Les résultats obtenus sont présentés figure 39.

À l'inverse des résultats précédents et malgré une légère augmentation du taux d'expression relatif de la luciférase de façon proportionnelle à la longueur de la séquence 3'UTR, nous avons considéré que le niveau d'activité de la luciférase est similaire quelque soit la taille de la région 3'UTR.

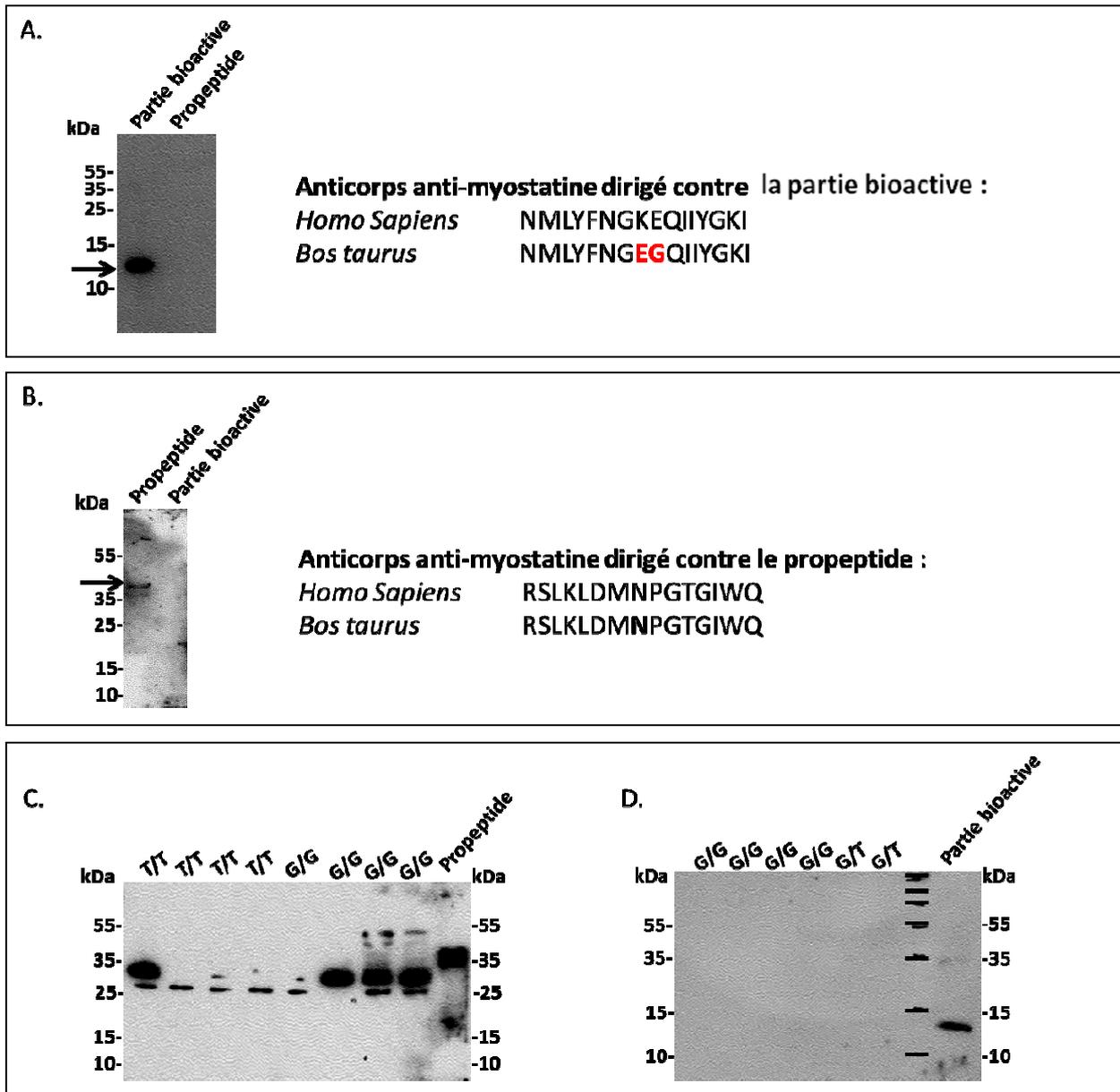


Figure 40 : Détection des formes protéiques de la myostatine par Western blot.

A, Le premier anticorps révèle la partie bioactive de la myostatine. Le peptide cible humain diffère du peptide cible bovin de deux acides aminés. **B,** Le second anticorps révèle le propeptide. **C,** Western blot utilisant l'anticorps ciblant le propeptide à partir des échantillons bovins. Nous n'avons pas pu conclure quant à la correspondance de ces bandes avec les formes protéiques de la myostatine. **D,** Western blot utilisant l'anticorps ciblant la partie bioactive à partir des échantillons bovins. Bien que cet anticorps nous permette de révéler la partie bioactive de la myostatine, il ne nous permet pas de révéler de bandes à partir de nos échantillons bovins.

4. Détection des produits de la maturation de la myostatine

a) Analyses par Western blot

Par cette approche nous avons tenté de visualiser les produits de maturation de la myostatine issu de l'expression de l'allèle *mh* atypique que nous avons découvert chez la Blonde d'Aquitaine. Le transcrit aberrant identifié au niveau musculaire et issu de cet allèle chez la Blonde d'Aquitaine, prédit la production d'une myostatine tronquée de sa partie bioactive et donc seul le propeptide serait produit. Néanmoins, la détection de la partie bioactive n'est pas à exclure. En effet, elle serait susceptible d'être produite à partir du transcrit correctement épissé (transcrit normal) puisqu'on arrive à le détecter chez les animaux homozygotes *G3811/G3811*. Par ailleurs, il n'est pas exclu que l'on découvre d'autres isoformes protéiques qui résulteraient d'épissages alternatifs comme le suggère l'analyse des ARNm du gène *myostatine* (cf. Résultats et Discussion II. 2.).

Comme nous ne disposons pas d'anticorps spécifique pour la myostatine bovine, nous avons décidé d'utiliser deux anticorps dirigés contre des séquences peptidiques humaines. L'un est dirigé contre le propeptide et l'autre contre la région bioactive (Fig. 40A et B).

Bien que les anticorps utilisés réagissent positivement à l'égard de leur antigène respectif (Fig. 40A et B), les résultats obtenus pour les extraits protéiques musculaires d'animaux de race Blonde d'Aquitaine de différents génotypes ne sont pas probants. Aucun signal n'est obtenu dans le cas de l'anticorps censé détecter la forme bioactive et l'anticorps dirigé contre le propeptide révèle des protéines de poids moléculaires incompatibles avec les tailles attendues. Pour l'anticorps dirigé contre un antigène de la partie bioactive de la myostatine, on note une différence d'homologie entre la séquence peptidique correspondante chez l'homme et chez le bovin (Fig. 40A). Cette différence de deux acides aminés pourrait expliquer la non détection de la myostatine à partir de nos échantillons protéiques bovins.

Nous avons testé d'autres anticorps mais aucun d'entre eux ne fonctionnent chez le bovin en western blot.

b) Dosage de la myostatine bioactive dans le sérum

Il est bien établi que la myostatine est présente sous forme latente dans le sérum des mammifères (Gonzalez-Cadavid et al., 1998). À défaut de détecter les produits de maturation de

Tableau 12 : Concentration en myostatine bioactive dans du sérum d'animaux de races Limousine, Blonde d'Aquitaine et Salers

Animaux Limousin	Concentration (pg/ml)						
L1	3490	L11	2420	L21	0	L31	2230
L2	2350	L12	3540	L22	3720	L32	2870
L3	3170	L13	3180	L23	2260	L33	4490
L4	4080	L14	1720	L24	1720	L34	4160
L5	3810	L15	2100	L25	3070	L35	2370
L6	5600	L16	4740	L26	2880	L36	2010
L7	740	L17	2700	L27	2780	L37	3770
L8	1110	L18	2430	L28	2140		
L9	3420	L19	2390	L29	2970	Animaux BA	Concentration (pg/ml)
L10	7820	L20	2180	L30	2340	B55	0
						B56	0
						B57	0
Animaux BA	Concentration (pg/ml)	Animaux BA	Concentration (pg/ml)	Animaux BA	Concentration (pg/ml)	B58	0
B21	0	B32	0	B43	0	B59	0
B22	0	B33	0	B46	0	B60	0
B24	0	B34	0	B47	0	B61	0
B25	0	B35	0	B48	0	B62	0
B26	0	B37	0	B49	220	B63	0
B27	0	B38	0	B50	0	B64	0
B28	0	B39	0	B51	0	B65	0
B29	0	B40	0	B52	0		
B30	0	B41	0	B53	0	Animaux Salers	Concentration (pg/ml)
B31	0	B42	0	B54	0	S47	0
						S48	200
Animaux Salers	Concentration (pg/ml)	Animaux Salers	Concentration (pg/ml)	Animaux Salers	Concentration (pg/ml)	S49	0
S2	410	S17	0	S32	0	S50	0
S3	270	S18	0	S33	350	S51	0
S4	0	S19	0	S34	0	S52	0
S5	460	S20	0	S36	660	S53	0
S6	0	S21	0	S37	160	S54	0
S7	n.a	S23	0	S38	0	S55	0
S8	190	S25	190	S39	0	S56	0
S9	0	S26	0	S40	0	S57	0
S10	260	S27	360	S41	0	S58	220
S11	0	S27b	0	S42	0	S59	0
S12	0	S28	0	S43	160	S60	270
S13	0	S28b	0	S44	0	S61	0
S14	n.a	S29	0	S45	0		
S15	510	S31	0	S46	510		

la myostatine (propeptide et partie bioactive) par une approche Western blot, nous avons tenté de quantifier la myostatine bioactive *via* le test ELISA développé par R&D systems. Pour ce faire, nous avons utilisé le sérum provenant d'animaux de race Blonde d'Aquitaine. Nous avons également associé à cette analyse des échantillons de sérum d'animaux de race Limousine et Salers. Il est à noter que l'association du variant F94L de la myostatine (Grobet et al., 1998) et le développement musculaire de la race Limousine n'est pas clairement établi. Par ailleurs, la race Salers ne présente pas de mutation décrite au niveau du gène *myostatine* et ne manifeste pas de développement musculaire notable. C'est pourquoi nous l'avons choisi comme contrôle positif pour le dosage de la myostatine dans le sérum.

Le tableau 12 récapitule les résultats obtenus. Comme attendu, la quasi-totalité des animaux (41 testés) de la race Blonde d'Aquitaine ne présente pas de myostatine bioactive détectable par le test ELISA. Seul un animal (B49) s'avère positif avec une concentration de 220 pg/ml. En revanche, la majorité des animaux Limousins (35 animaux parmi les 37 testés) présentent une myostatine bioactive circulante avec une concentration comprise entre 1110 et 7820 pg/ml. À notre grande surprise, parmi les 57 animaux Salers analysés seuls 15 animaux manifestent une concentration de myostatine bioactive comprise entre 160 et 660 pg/ml, une quantité largement inférieure à celle détectée chez les animaux Limousins.

En conclusion, le test nous a permis de confirmer que les animaux de race Blonde d'Aquitaine ne présentent pas de myostatine bioactive en accord avec l'expression majoritaire du transcrit aberrant qui prédit une protéine dépourvu de sa partie bioactive. À l'évidence, la faible quantité de myostatine qui serait produite à partir de la traduction du transcrit correctement épissé chez les animaux homozygotes pour la mutation *G3811 /G3811* n'est pas détectable par le test ELISA utilisé. La myostatine bioactive détectée chez la Limousine suggère que ce gène ne serait pas responsable du développement musculaire, qui par ailleurs reste équivalent voir supérieure à celui de la Blonde d'Aquitaine. Le cas de la salers est assez surprenant. En effet, on s'attendait à détecter la myostatine bioactive à un niveau au moins équivalent à celui de la Limousine. Nous n'avons pas d'explications raisonnées à ce constat pour l'instant.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Après la découverte du gène *myostatine* en 1997 (McPherron et al., 1997), et de l'implication de mutations perte de fonction de ce gène dans l'apparition de phénotype hypermusclé, plusieurs allèles ont été rapportés chez l'homme (Schuelke et al., 2004), chez le mouton (Clop et al., 2006; Takeda et al., 2010) et chez plusieurs races bovines (Grobet et al., 1997, 1998; Kambadur et al., 1997; McPherron and Lee, 1997). La race bovine Blonde d'Aquitaine avec un développement musculaire remarquable est restée jusqu'alors réfractaire à une découverte de mutations au niveau du gène *myostatine*. Cette race bovine française, la 3^{ème} race à viande après les races Charolaise et Limousine, présentent une très bonne valorisation économique de sa viande qui est de meilleure qualité.

Au cours des deux premières années de ma thèse, nous nous sommes donc adonnés à l'identification de la mutation causale du phénotype d'hypertrophie musculaire en race Blonde d'Aquitaine en nous focalisant sur une étude fine du gène *myostatine*. Nous avons identifié *via* l'étude de l'ARNm une mutation au sein de l'intron 2 du gène *myostatine* (Bouyer et al., 2014). Cette mutation est exclusivement présente en race Blonde d'Aquitaine. Cette caractéristique nous a permis de mettre en place un test génétique de sélection des animaux porteurs ou non de l'allèle muté. Les premiers résultats de ces tests génétiques montrent que les animaux de race Blonde d'Aquitaine déjà sélectionnés par l'observation visuelle de leur conformation sont porteurs de l'allèle muté au moins à l'état hétérozygote (association génotype/phénotype). Toutefois, l'utilisation de ce test génétique pourrait être utile dans la sélection d'animaux homozygotes mutants ou sauvages pour l'obtention d'une génération F1 hétérozygotes et de phénotype intermédiaire.

Cette mutation entraîne « l'exonisation » d'une séquence originellement intronique du gène *myostatine*. Ce transcrit présentant une séquence exonique supplémentaire est stable malgré la présence de deux codons STOP prématurés codés par deux triplets de cet exon supplémentaire. Nous avons donc suggéré que ce transcrit échappait aux mécanismes de surveillance NMD puisqu'il est bien connu que le complexe NMD ne reconnaît les codons STOP prématurés que s'ils sont localisés à plus de 50-pb de la dernière jonction exon-exon, ce qui n'est pas le cas ici.

Par ailleurs, nous avons montré que le transcrit aberrant est fortement représenté dans le muscle. Nous suggérons que cette abondance transcriptionnelle résulte d'une part d'une dérégulation de l'activité du promoteur du gène *myostatine* et d'autre part du fait que ce transcrit aberrant avec un codon STOP prématuré est réfractaire au NMD. De plus, nous avons montré qu'une quantité résiduelle de transcrits correctement épissés est produite, ce qui nous a mené à proposer que la mutation est *leaky* vis-à-vis de l'activité du spliceosome. Ensemble, ces trois événements (résistance au NMD, dérégulation de l'activité du promoteur, production de transcrit canonique) œuvrent pour le bien de l'animal et l'intérêt de l'homme. En effet, l'apparition de la mutation et la concomitance des trois événements évoqués ci-dessus permettent à l'animal d'échapper à un développement musculaire excessif, qui, chez le bovin (exemple : Blanc Bleu Belge) s'accompagne entre autres, d'une réduction de la fertilité, d'une augmentation de la mortalité à la naissance et l'usage systématique d'une césarienne à cause d'une large conformation du veau à la naissance.

Bien que l'association génotype (*G3811/G8311*)/phénotype (masse musculaire) de ce nouvel allèle *mh* chez la Blonde d'Aquitaine est avéré, d'autres allèles à effets majeur ou mineur seraient impliqués. En effet, une certaine variabilité quantitative et qualitative de la viande intrarace est communément constaté et économiquement problématique pour la profession.

Sur la base des données acquises lors de cette formation doctorale, mais aussi des données bibliographiques, nous pensons qu'une expressivité variable de l'allèle *mh* découvert, pourrait expliquer une part de cette variabilité phénotypique. En effet, nous avons montré que l'allèle s'exprime de façon variable selon les animaux et en plus qu'il produit une certaine quantité de transcrits canoniques qui, elle aussi est variable selon les animaux (Bouyer et al., 2014). Malheureusement, pour l'instant, nous n'avons pas pu déterminer les rapports transcrits aberrants/transcrits canoniques et encore moins son association avec le phénotype des animaux. Par ailleurs, la découverte de plusieurs isoformes du transcrit du gène *myostatine* y compris chez la Blonde d'Aquitaine (travail présent) et dont certains possèdent un rôle physiologique (Jeanplong et al., 2013) ne simplifie pas les raisonnements. Par conséquent, les perspectives de ce travail sont nombreuses aussi bien pour des aspects appliqués que fondamentaux.

En dehors, d'une étude fonctionnelle des différents isoformes qu'il faudrait réaliser, il est très important de disposer d'un moyen pour déterminer les quantités des transcrits canonique et aberrant chez les animaux de race Blonde d'Aquitaine de conformations différentes. Nous

n'avons pas réussi à quantifier les transcrits canoniques par une approche basée sur l'utilisation de sondes TaqMan, alors qu'ils sont détectable en PCR classique (Bouyer et al., 2014). Une autre alternative serait une approche *in vitro via* des cellules myoblastique exprimant l'allèle *mh* Blonde d'Aquitaine, ce qui permettrait de travailler à l'échelle cellulaire et de disposer de matériel biologique à volonté. Hormis un impact presque certain sur la prolifération myoblastique, cette approche ne résoudra pas la question majeure posée pour la poursuite de ce travail : la maîtrise de la variabilité phénotypique de la production et la qualité de la viande chez la Blonde d'Aquitaine. Une autre alternative, qui nous rapprocherait le plus à l'échelle de l'animal serait de créer une lignée murine exprimant de façon approprié l'allèle *mh* découvert chez la Blonde d'Aquitaine. Nous disposons de compétences dans ce sens au sein de notre groupe dirigé par le Pr Véronique Blanquet. Les données, qui seront acquises dans ce cadre seraient plus pertinentes pour contribuer à élucider les mécanismes moléculaires relatifs à la variabilité phénotypique du développement musculaire chez la race bovine Blonde d'Aquitaine en particulier.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

A-

Allen, D.L., and Du, M. (2008). Comparative functional analysis of the cow and mouse myostatin genes reveals novel regulatory elements in their upstream promoter regions. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 150, 432–439.

Allen, D.L., and Loh, A.S. (2011). Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C124–C137.

Allen, D.L., and Unterman, T.G. (2007). Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C188–C199.

Allen, D.L., Cleary, A.S., Speaker, K.J., Lindsay, S.F., Uyenishi, J., Reed, J.M., Madden, M.C., and Mehan, R.S. (2008). Myostatin, activin receptor IIB, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E918–E927.

Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., et al. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282, 1711–1714.

Amthor, H., Huang, R., McKinnell, I., Christ, B., Kambadur, R., Sharma, M., and Patel, K. (2002). The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Dev. Biol.* 251, 241–257.

Amthor, H., Otto, A., Vulin, A., Rochat, A., Dumonceaux, J., Garcia, L., Mouisel, E., Hourdé, C., Macharia, R., Friedrichs, M., et al. (2009). Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7479–7484.

Andersen, J.L., Schjerling, P., and Saltin, B. (2000). Muscle, genes and athletic performance. *Sci. Am.* 283, 48–55.

Anderson, S.B., Goldberg, A.L., and Whitman, M. (2008). Identification of a novel pool of extracellular pro-myostatin in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 283, 7027–7035.

Arthur, P.F., Makarechian, M., and Price, M.A. (1988). Incidence of Dystocia and Perinatal Calf Mortality Resulting from Reciprocal Crossing of Double-muscled and Normal Cattle. *Can. Vet. J.* 29, 163–167.

Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., and Sporn, M.B. (1983). Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 258, 7155–7160.

Aulehla, A., Wehrle, C., Brand-Saberi, B., Kemler, R., Gossler, A., Kanzler, B., and Herrmann, B.G. (2003). Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev. Cell* 4, 395–406.

B-

Bailey, A.J., Enser, M.B., Dransfield, E., Restall, D.J., and Avery, N.C. (1982). Muscle and Adipose Tissue from Normal and Double Muscled Cattle: Collagen Types, Muscle Fibre Diameter, Fat Cell Size and Fatty Acid Composition and Organoleptic Properties. In *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production*, J.W.B. King, and F. Ménéssier, eds. (Springer Netherlands), pp. 178–202.

Beudart, C., Gillain, S., Petermans, J., Reginster, J.Y., and Bruyère, O. (2014). [Sarcopenia: what's new in 2014]. *Rev. Médicale Liège* 69, 251–257.

Bell, M.L., Buvoli, M., and Leinwand, L.A. (2010). Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1937–1945.

Benny Klimek, M.E., Aydogdu, T., Link, M.J., Pons, M., Koniaris, L.G., and Zimmers, T.A. (2010). Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1548–1554.

Berry, C., Thomas, M., Langley, B., Sharma, M., and Kambadur, R. (2002). Single cysteine to tyrosine transition inactivates the growth inhibitory function of Piedmontese myostatin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C135–C141.

Bessho, Y., and Kageyama, R. (2003). Oscillations, clocks and segmentation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 379–384.

Bidwell, C.A., Waddell, J.N., Taxis, T.M., Yu, H., Tellam, R.L., Neary, M.K., and Cockett, N.E. (2014). New insights into polar overdominance in callipyge sheep. *Anim. Genet.* 45 *Suppl 1*, 51–61.

Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768–771.

Blau, H.M., Webster, C., and Pavlath, G.K. (1983). Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 4856–4860.

Boccard, R., Dumont, B., and Talmant, A. (1974). Conséquences de l'hypertrophie musculaire héréditaire des bovins sur la musculature. *Ann. Génétique Sélection Anim.* 6, 177–186.

Bogdanovich, S., Krag, T.O.B., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittemore, L.-A., Ahima, R.S., and Khurana, T.S. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420, 418–421.

Bouyer, C., Forestier, L., Renand, G., and Oulmouden, A. (2014). Deep Intronic Mutation and Pseudo Exon Activation as a Novel Muscular Hypertrophy Modifier in Cattle. *PLoS ONE* 9, e97399.

Brand-Saberri, B., Krenn, V., Grim, M., and Christ, B. (1993). Differences in the fibronectin-dependence of migrating cell populations. *Anat. Embryol. (Berl.)* 187, 17–26.

Brand-Saberri, B., Müller, T.S., Wilting, J., Christ, B., and Birchmeier, C. (1996a). Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo. *Dev. Biol.* 179, 303–308.

Brand-Saberri, B., Gamel, A.J., Krenn, V., Müller, T.S., Wilting, J., and Christ, B. (1996b). N-cadherin is involved in myoblast migration and muscle differentiation in the avian limb bud. *Dev. Biol.* 178, 160–173.

Braun, T., and Gautel, M. (2011). Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 349–361.

C-

Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.-H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.-P., Chen, J.-F., Deng, Z., Gunn, B., Shumate, J., et al. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 2772–2786.

Carlson, C.J., Booth, F.W., and Gordon, S.E. (1999). Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am. J. Physiol.* 277, R601–R606.

Castelhano-Barbosa, E.C., Gabriel, J.E., Alvares, L.E., Monteiro-Vitorello, C.B., and Coutinho, L.L. (2005). Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development. *Growth Dev. Aging GDA* 69, 3–12.

Cervantes, I., Gutiérrez, J.P., Fernández, I., and Goyache, F. (2010). Genetic relationships among calving ease, gestation length, and calf survival to weaning in the Asturiana de los Valles beef cattle breed. *J. Anim. Sci.* 88, 96–101.

Charlier, C., Coppieters, W., Farnir, F., Grobet, L., Leroy, P.L., Michaux, C., Mni, M., Schwerts, A., Vanmanshoven, P., and Hanset, R. (1995). The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 6, 788–792.

Charlier, C., Segers, K., Karim, L., Shay, T., Gyapay, G., Cockett, N., and Georges, M. (2001). The callipyge mutation enhances the expression of coregulated imprinted genes in cis without affecting their imprinting status. *Nat. Genet.* 27, 367–369.

Christ, B., Huang, R., and Scaal, M. (2004). Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat. Embryol. (Berl.)* 208, 333–350.

Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibé, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J.-M., Eychenne, F., et al. (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet.* 38, 813–818.

Cooke, J., and Zeeman, E.C. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *J. Theor. Biol.* 58, 455–476.

Coutard, J.P., Menard, M., Benoteau, G., Lucas, F., Henry, J.M., Chaigneau, F., and Raimbault, B. (2007). Reproduction of suckling herds in the Pays de la Loire: factors of performance variations. (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)), pp. 359–362.

Covi, J.A., Kim, H.-W., and Mykles, D.L. (2008). Expression of alternatively spliced transcripts for a myostatin-like protein in the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 150, 423–430.

Culley, G. (1807). *Observations on Live Stock: Containing Hints for Choosing and Improving the Best Breeds of the Most Useful Kinds of Domestic Animals* (G. Wilkie and J. Robinson).

Culley, M. (2002). *Matthew and George Culley: travel journals and letters, 1765-1798* / (Oxford ; Oxford University Press,).

Cunningham, N.S., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Reddi, A.H., and Lee, S.J. (1995). Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3. *Growth Factors Chur Switz.* 12, 99–109.

D-

Dale, J.K., Maroto, M., Dequeant, M.-L., Malapert, P., McGrew, M., and Pourquie, O. (2003). Periodic Notch inhibition by Lunatic Fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* 421, 275–278.

Dequéant, M.-L., and Pourquié, O. (2008). Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat. Rev. Genet.* 9, 370–382.

Diez del Corral, R., Olivera-Martinez, I., Goriely, A., Gale, E., Maden, M., and Storey, K. (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65–79.

Druet, T., Ahariz, N., Cambisano, N., Tamma, N., Michaux, C., Coppieters, W., Charlier, C., and Georges, M. (2014). Selection in action: dissecting the molecular underpinnings of the increasing muscle mass of Belgian Blue Cattle. *BMC Genomics* 15, 796.

Drummond, M.J., Glynn, E.L., Fry, C.S., Dhanani, S., Volpi, E., and Rasmussen, B.B. (2009). Essential amino acids increase microRNA-499, -208b, and -23a and downregulate myostatin and myocyte enhancer factor 2C mRNA expression in human skeletal muscle. *J. Nutr.* 139, 2279–2284.

Du, R., An, X.-R., Chen, Y.-F., and Qin, J. (2007). Some motifs were important for myostatin transcriptional regulation in sheep (*Ovis aries*). *J. Biochem. Mol. Biol.* *40*, 547–553.

Dubrulle, J., McGrew, M.J., and Pourquié, O. (2001). FGF signaling controls somite boundary position and regulates segmentation clock control of spatiotemporal Hox gene activation. *Cell* *106*, 219–232.

Duris, M.P., Renand, G., and Picard, B. (1999). Genetic variability of foetal bovine myoblasts in primary culture. *Histochem. J.* *31*, 753–760.

E-

Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y., and Maas, R.L. (1996). Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4213–4218.

Evans, W.J., Morley, J.E., Argilés, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., Jatoi, A., Kalantar-Zadeh, K., Lochs, H., Mantovani, G., et al. (2008). Cachexia: a new definition. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* *27*, 793–799.

F-

Forbes, D., Jackman, M., Bishop, A., Thomas, M., Kambadur, R., and Sharma, M. (2006). Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* *206*, 264–272.

Freking, B.A., Murphy, S.K., Wylie, A.A., Rhodes, S.J., Keele, J.W., Leymaster, K.A., Jirtle, R.L., and Smith, T.P.L. (2002). Identification of the single base change causing the callipyge muscle hypertrophy phenotype, the only known example of polar overdominance in mammals. *Genome Res.* *12*, 1496–1506.

Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V.K., Weiler, J.E., O'Brien, P.J., and MacLennan, D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* *253*, 448–451.

G-

Gagnière, H., Picard, B., Jurie, C., and Geay, Y. (1997). Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-musled cattle. *Meat Sci.* *45*, 145–152.

Garikipati, D.K., Gahr, S.A., and Rodgers, B.D. (2006). Identification, characterization, and quantitative expression analysis of rainbow trout myostatin-1a and myostatin-1b genes. *J. Endocrinol.* *190*, 879–888.

Garikipati, D.K., Gahr, S.A., Roalson, E.H., and Rodgers, B.D. (2007). Characterization of rainbow trout myostatin-2 genes (rtMSTN-2a and -2b): genomic organization, differential expression, and pseudogenization. *Endocrinology* *148*, 2106–2115.

Georges, M., Charlier, C., and Cockett, N. (2003). The callipyge locus: evidence for the trans interaction of reciprocally imprinted genes. *Trends Genet. TIG* 19, 248–252.

Gerrard, D.E., and Judge, M.D. (1993). Induction of myoblast proliferation in L6 myoblast cultures by fetal serum of double-muscled and normal cattle. *J. Anim. Sci.* 71, 1464–1470.

Gilson, H., Schakman, O., Kalista, S., Lause, P., Tsuchida, K., and Thissen, J.-P. (2009). Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E157–E164.

Girgenrath, S., Song, K., and Whittemore, L.-A. (2005). Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle Nerve* 31, 34–40.

Glass, D., and Roubenoff, R. (2010). Recent advances in the biology and therapy of muscle wasting. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1211, 25–36.

Gonzalez-Cadavid, N.F., Taylor, W.E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., Ezzat, S., Shen, R., Lalani, R., Asa, S., Mamita, M., et al. (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14938–14943.

Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménessier, F., Massabanda, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17, 71–74.

Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Ménessier, F., Zanotti, M., Dunner, S., and Georges, M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 9, 210–213.

H-

Hanset, R., and Michaux, C. (1982). Creatine and Creatinine Levels in Plasma, Red Cells and Muscles as Characteristics of Double-Muscled Cattle. In *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and Its Use to Improve Beef Production*, J.W.B. King, and F. Ménessier, eds. (Springer Netherlands), pp. 237–256.

Hanset, R., and Michaux, C. (1985a). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. I. Experimental data. *Genet. Sel. Evol.* 17, 359.

Hanset, R., and Michaux, C. (1985b). On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. II. Population data. *Genet. Sel. Evol.* 17, 369.

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., and Klein, W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506.

- Heslop, L., Morgan, J.E., and Partridge, T.A. (2000). Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J. Cell Sci.* *113* (Pt 12), 2299–2308.
- Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., and Qiu, Y. (2002). The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem.* *277*, 40735–40741.
- Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M., and Wolfman, N.M. (2003). Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 1144–1154.
- Hitachi, K., and Tsuchida, K. (2013). Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front. Physiol.* *4*, 408.
- Hitachi, K., Nakatani, M., and Tsuchida, K. (2014). Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *47*, 93–103.
- Hoflack, G., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Opsomer, G., and Duchateau, L. (2006a). Breeding soundness and libido examination of Belgian Blue and Holstein Friesian artificial insemination bulls in Belgium and The Netherlands. *Theriogenology* *66*, 207–216.
- Hoflack, G., Opsomer, G., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., and Duchateau, L. (2006b). Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls. *Theriogenology* *66*, 1834–1846.
- Hoflack, G., Van den Broeck, W., Maes, D., Van Damme, K., Opsomer, G., Duchateau, L., de Kruif, A., Rodriguez-Martinez, H., and Van Soom, A. (2008). Testicular dysfunction is responsible for low sperm quality in Belgian Blue bulls. *Theriogenology* *69*, 323–332.
- Horbelt, D., Denkis, A., and Knaus, P. (2012). A portrait of Transforming Growth Factor β superfamily signalling: Background matters. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 469–474.
- Hu, S., Chen, C., Sheng, J., Sun, Y., Cao, X., and Qiao, J. (2010). Enhanced muscle growth by plasmid-mediated delivery of myostatin propeptide. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 862591.
- Huang, Z., Chen, D., Zhang, K., Yu, B., Chen, X., and Meng, J. (2007). Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. *Cell. Signal.* *19*, 2286–2295.
- Huang, Z., Chen, X., Yu, B., He, J., and Chen, D. (2012). MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *423*, 265–269.
- Huxley, H.E. (1969). The Mechanism of Muscular Contraction. *Science* *164*, 1356–1366.
- Huxley, H.E. (1985). The crossbridge mechanism of muscular contraction and its implications. *J. Exp. Biol.* *115*, 17–30.
- Huxley, A.F., and Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* *173*, 971–973.

Huxley, H., and Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973–976.

I-

Isken, O., and Maquat, L.E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* 21, 1833–1856.

Iwasaki, S., Miyake, M., Watanabe, H., Kitagawa, E., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M.T., and Aso, H. (2013). Expression of myostatin in neural cells of the olfactory system. *Mol. Neurobiol.* 47, 1–8.

J-

Jeanplong, F., Sharma, M., Somers, W.G., Bass, J.J., and Kambadur, R. (2001). Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Mol. Cell. Biochem.* 220, 31–37.

Jeanplong, F., Falconer, S.J., Oldham, J.M., Thomas, M., Gray, T.S., Hennebry, A., Matthews, K.G., Kemp, F.C., Patel, K., Berry, C., et al. (2013). Discovery of a Mammalian splice variant of myostatin that stimulates myogenesis. *PloS One* 8, e81713.

Ji, S., Losinski, R.L., Cornelius, S.G., Frank, G.R., Willis, G.M., Gerrard, D.E., Depreux, F.F.S., and Spurlock, M.E. (1998). Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275, R1265–R1273.

Jiang, M.Y., and Sheetz, M.P. (1994). Mechanics of myosin motor: force and step size. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 16, 531–532.

Johnson, G.B., Raven, P.H., Losos, J.B., and Singer, S.R. (2011). *Biologie - Version luxe* (De Boeck Supérieur).

Joulià, D., Bernardi, H., Garandel, V., Rabenoelina, F., Vernus, B., and Cabello, G. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res.* 286, 263–275.

K-

Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., and Bass, J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscle Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.* 7, 910–916.

Kang, J.K., Malerba, A., Popplewell, L., Foster, K., and Dickson, G. (2011). Antisense-induced myostatin exon skipping leads to muscle hypertrophy in mice following octa-guanidine morpholino oligomer treatment. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 19, 159–164.

Karim, L., Coppieters, W., Grobet, L., Valentini, A., and Georges, M. (2000). Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim. Genet.* *31*, 396–399.

Karp, G. (2010). *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments (De Boeck Supérieur)*.

Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* *431*, 466–471.

Keller, T.C. (1995). Structure and function of titin and nebulin. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 32–38.

Kerr, T., Roalson, E.H., and Rodgers, B.D. (2005). Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evol. Dev.* *7*, 390–400.

Kidwell, J.F., Vernon, E.H., Crown, R.M., and Singletary, C.B. (1952). Muscular Hypertrophy in Cattle. *J. Hered.* *43*, 63–68.

Kim, H.S., Liang, L., Dean, R.G., Hausman, D.B., Hartzell, D.L., and Baile, C.A. (2001). Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *281*, 902–906.

Kim, H.-W., Mykles, D.L., Goetz, F.W., and Roberts, S.B. (2004). Characterization of a myostatin-like gene from the bay scallop, *Argopecten irradians*. *Biochim. Biophys. Acta* *1679*, 174–179.

Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Middlesworth, W., Ochs, H.D., and Latt, S.A. (1985). Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 4778–4782.

L-

Langley, B., Thomas, M., Bishop, A., Sharma, M., Gilmour, S., and Kambadur, R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.* *277*, 49831–49840.

De Larco, J.E., and Todaro, G.J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *75*, 4001–4005.

Latres, E., Amini, A.R., Amini, A.A., Griffiths, J., Martin, F.J., Wei, Y., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2005). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J. Biol. Chem.* *280*, 2737–2744.

Lauvergne, J.J., Vissac B., Perramon A. (1963). Etude du caractère culard : I. Mise au point bibliographique. *Ann. Zootech.* *12* (2), 133-156.

Lee, S.J., and McPherron, A.C. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9306–9311.

Lee, S.-J., Huynh, T.V., Lee, Y.-S., Sebald, S.M., Wilcox-Adelman, S.A., Iwamori, N., Lepper, C., Matzuk, M.M., and Fan, C.-M. (2012). Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2353–E2360.

Lexell, J. (1997). Evidence for nervous system degeneration with advancing age. *J. Nutr.* 127, 1011S – 1013S.

Li, Z., Zhao, B., Kim, Y.S., Hu, C.Y., and Yang, J. (2010). Administration of a mutated myostatin propeptide to neonatal mice significantly enhances skeletal muscle growth. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 76–82.

Lin, J., Arnold, H.B., Della-Fera, M.A., Azain, M.J., Hartzell, D.L., and Baile, C.A. (2002). Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 701–706.

Listrat, A., Picard, B., Jailler, R., Collignon, H., Peccatte, J.-R., Micol, D., Geay, Y., and Dozias, D. (2001). Grass valorisation and muscular characteristics of blonde d'Aquitaine steers. *Anim. Res.* 50, 105–118.

Liu, D., Black, B.L., and Derynck, R. (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* 15, 2950–2966.

Lo, P.C., and Frasch, M. (1999). Sequence and expression of myoglianin, a novel Drosophila gene of the TGF-beta superfamily. *Mech. Dev.* 86, 171–175.

Long, D., Zhang, K., Chen, D., Ding, X., and Yu, B. (2009). Effects of active immunization against myostatin on carcass quality and expression of the myostatin gene in pigs. *Anim. Sci. J.* 80, 585–590.

M-

Ma, K., Mallidis, C., Artaza, J., Taylor, W., Gonzalez-Cadavid, N., and Bhasin, S. (2001). Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1128–E1136.

Ma, K., Mallidis, C., Bhasin, S., Mahabadi, V., Artaza, J., Gonzalez-Cadavid, N., Arias, J., and Salehian, B. (2003). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285, E363–E371.

Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Radaelli, G., Mascarello, F., and Patarnello, T. (2001). Characterization of the myostatin gene in the gilthead seabream (*Sparus aurata*): sequence, genomic structure, and expression pattern. *Mar. Biotechnol. N. Y.* N 3, 224–230.

- Malerba, A., Kang, J.K., McClorey, G., Saleh, A.F., Popplewell, L., Gait, M.J., Wood, M.J., and Dickson, G. (2012). Dual Myostatin and Dystrophin Exon Skipping by Morpholino Nucleic Acid Oligomers Conjugated to a Cell-penetrating Peptide Is a Promising Therapeutic Strategy for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e62.
- Marchitelli, C., Savarese, M.C., Crisà, A., Nardone, A., Marsan, P.A., and Valentini, A. (2003). Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* 14, 392–395.
- Matsakas, A., Foster, K., Otto, A., Macharia, R., Elashry, M.I., Feist, S., Graham, I., Foster, H., Yaworsky, P., Walsh, F., et al. (2009). Molecular, cellular and physiological investigation of myostatin propeptide-mediated muscle growth in adult mice. *Neuromuscul. Disord.* NMD 19, 489–499.
- Matzuk, M.M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D.R., and Bradley, A. (1995). Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature* 374, 360–363.
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 493–495.
- McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., and Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell Biol.* 162, 1135–1147.
- McCroskery, S., Thomas, M., Platt, L., Hennebry, A., Nishimura, T., McLeay, L., Sharma, M., and Kambadur, R. (2005). Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J. Cell Sci.* 118, 3531–3541.
- McFarlane, C., Plummer, E., Thomas, M., Hennebry, A., Ashby, M., Ling, N., Smith, H., Sharma, M., and Kambadur, R. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 209, 501–514.
- McFarlane, C., Vajjala, A., Arigela, H., Lokireddy, S., Ge, X., Bonala, S., Manickam, R., Kambadur, R., and Sharma, M. (2014). Negative auto-regulation of myostatin expression is mediated by Smad3 and microRNA-27. *PloS One* 9, e87687.
- McPherron, A.C., and Lee, S.J. (1993). GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J. Biol. Chem.* 268, 3444–3449.
- McPherron, A.C., and Lee, S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12457–12461.
- McPherron, A.C., and Lee, S.-J. (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 109, 595–601.
- McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83–90.

Ménissier, 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*, J.W.B. King, and F. Ménissier, eds. (Springer Netherlands), pp. 23–53.

Ménissier, 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*, J.W.B. King, and F. Ménissier, eds. (Springer Netherlands), pp. 387–428.

Michele, D.E., and Campbell, K.P. (2003). Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J. Biol. Chem.* 278, 15457–15460.

Miretti, S., Martignani, E., Accornero, P., and Baratta, M. (2013). Functional effect of mir-27b on myostatin expression: a relationship in Piedmontese cattle with double-muscled phenotype. *BMC Genomics* 14, 194.

Mitchell, P.J., Johnson, S.E., and Hannon, K. (2002). Insulin-like growth factor I stimulates myoblast expansion and myofiber development in the limb. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 223, 12–23.

Miura, T., Kishioka, Y., Wakamatsu, J., Hattori, A., Hennebry, A., Berry, C.J., Sharma, M., Kambadur, R., and Nishimura, T. (2006). Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 675–680.

Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646–650.

Moreira, E.S., Vainzof, M., Marie, S.K., Sertié, A.L., Zatz, M., and Passos-Bueno, M.R. (1997). The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am. J. Hum. Genet.* 61, 151–159.

Moreira, E.S., Wiltshire, T.J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O.T., Valle, G., Reeves, R., Zatz, M., Passos-Bueno, M.R., et al. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat. Genet.* 24, 163–166.

Moreno, T.A., and Kintner, C. (2004). Regulation of segmental patterning by retinoic acid signaling during *Xenopus* somitogenesis. *Dev. Cell* 6, 205–218.

Morine, K.J., Bish, L.T., Selsby, J.T., Gazzara, J.A., Pendrak, K., Sleeper, M.M., Barton, E.R., Lee, S.-J., and Sweeney, H.L. (2010). Activin IIB receptor blockade attenuates dystrophic pathology in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 42, 722–730.

Mosher, D.S., Quignon, P., Bustamante, C.D., Sutter, N.B., Mellersh, C.S., Parker, H.G., and Ostrander, E.A. (2007). A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 3, e79.

Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2003). Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol. Biol. Cell* 14, 2809–2817.

Murphy, K.T., Koopman, R., Naim, T., Léger, B., Trieu, J., Ibebunjo, C., and Lynch, G.S. (2010). Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 4433–4442.

N-

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., and Nabeshima, Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* 364, 532–535.

Nakatani, M., Takehara, Y., Sugino, H., Matsumoto, M., Hashimoto, O., Hasegawa, Y., Murakami, T., Uezumi, A., Takeda, S., Noji, S., et al. (2008). Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 477–487.

Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C.F., Sharma, M., and Kambadur, R. (2002). Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J. Cell. Physiol.* 193, 120–131.

O-

O'Brien, P.J. (1986). Porcine malignant hyperthermia susceptibility: hypersensitive calcium-release mechanism of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Can. J. Vet. Res. Rev. Can. Rech. Vét.* 50, 318–328.

Okayama, H., and Berg, P. (1982). High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 2, 161–170.

Oldham, J.M., Martyn, J.A., Sharma, M., Jeanplong, F., Kambadur, R., and Bass, J.J. (2001). Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1488–R1493.

Ollivier, L., Dando, P., Felgines, C., and Perretant, M.-R. (1980). Le déterminisme génétique de l'hypertrophie musculaire chez le Porc. *Ann. Génétique Sélection Anim.* 12, 383–394.

Østbye, T.K., Galloway, T.F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., and Andersen Ø, null (2001). The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *Eur. J. Biochem. FEBS* 268, 5249–5257.

Ostbye, T.-K.K., Wetten, O.F., Tooming-Klunderud, A., Jakobsen, K.S., Yafe, A., Etzioni, S., Moen, T., and Andersen, O. (2007). Myostatin (MSTN) gene duplications in Atlantic salmon (*Salmo salar*): evidence for different selective pressure on teleost MSTN-1 and -2. *Gene* 403, 159–169.

Ott, M.O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H., and Buckingham, M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* *111*, 1097–1107.

P-

Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., and Pourquié, O. (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* *91*, 639–648.

Perrini, S., Laviola, L., Carreira, M.C., Cignarelli, A., Natalicchio, A., and Giorgino, F. (2010). The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J. Endocrinol.* *205*, 201–210.

Philip, B., Lu, Z., and Gao, Y. (2005). Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell. Signal.* *17*, 365–375.

Phillips, R., and Ráb, P. (2001). Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* *76*, 1–25.

Postlethwait, J.H., Yan, Y.L., Gates, M.A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E.S., Force, A., Gong, Z., et al. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* *18*, 345–349.

Q-

Quesada, A.S., and Cachafeiro, E.B. (1972). Etude génétique du caractère culard. *Ann. Génétique Sélection Anim.* *4*, 132.

R-

Ramazanov, Z., Jimenez del Rio, M., and Ziegenfuss, T. (2003). Sulfated polysaccharides of brown seaweed *Cystoseira canariensis* bind to serum myostatin protein. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* *27*, 101–106.

Ray, P.N., Belfall, B., Duff, C., Logan, C., Kean, V., Thompson, M.W., Sylvester, J.E., Gorski, J.L., Schmickel, R.D., and Worton, R.G. (1985). Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* *318*, 672–675.

Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C., and Milligan, R.A. (1993). Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* *261*, 58–65.

Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J.L., Celeste, A.J., and Attisano, L. (2003). Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7230–7242.

- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., and Buckingham, M. (2005). A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953.
- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M., and Devesa, J. (2001). Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 561–566.
- Ríos, R., Carneiro, I., Arce, V.M., and Devesa, J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C993–C999.
- Riquelme, C., Larrain, J., Schonherr, E., Henriquez, J.P., Kresse, H., and Brandan, E. (2001). Antisense inhibition of decorin expression in myoblasts decreases cell responsiveness to transforming growth factor beta and accelerates skeletal muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 3589–3596.
- Rizzoli, R., Reginster, J.-Y., Arnal, J.-F., Bautmans, I., Beudart, C., Bischoff-Ferrari, H., Biver, E., Boonen, S., Brandi, M.-L., Chines, A., et al. (2013). Quality of life in sarcopenia and frailty. *Calcif. Tissue Int.* 93, 101–120.
- Roberts, S.B., and Goetz, F.W. (2001). Differential skeletal muscle expression of myostatin across teleost species, and the isolation of multiple myostatin isoforms. *FEBS Lett.* 491, 212–216.
- Roberts, A.B., Lamb, L.C., Newton, D.L., Sporn, M.B., De Larco, J.E., and Todaro, G.J. (1980). Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3494–3498.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M., and Sporn, M.B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 5339–5343.
- Roberts, A.B., Frolik, C.A., Anzano, M.A., and Sporn, M.B. (1983). Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed. Proc.* 42, 2621–2626.
- Rodgers, B.D., and Weber, G.M. (2001). Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129, 597–603.
- Rodgers, B.D., Weber, G.M., Sullivan, C.V., and Levine, M.A. (2001). Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology* 142, 1412–1418.
- Rodriguez, J., Vernus, B., Chelh, I., Cassar-Malek, I., Gabillard, J.C., Hadj Sassi, A., Seiliez, I., Picard, B., and Bonniou, A. (2014). Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.*
- Rowe, D.J. (1971). The Culleys, Northumberland Farmers, 1767-1813. *Agric. Hist. Rev.* 156–174.

S-

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098–1101.

Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R., and Sandri, M. (2009). Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C1248–C1257.

Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H., and Buckingham, M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* *341*, 303–307.

Scaal, M., and Christ, B. (2004). Formation and differentiation of the avian dermomyotome. *Anat. Embryol. (Berl.)* *208*, 411–424.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.* *91*, 1447–1531.

Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K., and Lømo, T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *10*, 197–205.

Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F., and Lee, S.-J. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* *350*, 2682–2688.

Scott, I.C., Blitz, I.L., Pappano, W.N., Imamura, Y., Clark, T.G., Steiglit, B.M., Thomas, C.L., Maas, S.A., Takahara, K., Cho, K.W., et al. (1999). Mammalian BMP-1/Tolloid-related metalloproteinases, including novel family member mammalian Tolloid-like 2, have differential enzymatic activities and distributions of expression relevant to patterning and skeletogenesis. *Dev. Biol.* *213*, 283–300.

Sharma, M., Kambadur, R., Matthews, K.G., Somers, W.G., Devlin, G.P., Conaglen, J.V., Fowke, P.J., and Bass, J.J. (1999). Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell. Physiol.* *180*, 1–9.

Shelton, G.D., and Engvall, E. (2007). Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. *Neuromuscul. Disord.* *NMD 17*, 721–722.

Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., and Cao, X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J. Cell Biol.* *164*, 291–300.

Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., and Barnard, P.J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* *244*, 1578–1580.

Smit, M., Segers, K., Carrascosa, L.G., Shay, T., Baraldi, F., Gyapay, G., Snowden, G., Georges, M., Cockett, N., and Charlier, C. (2003). Mosaicism of Solid Gold supports the causality of a noncoding A-to-G transition in the determinism of the callipyge phenotype. *Genetics* 163, 453–456.

Smith, J.A., Lewis, A.M., Wiener, P., and Williams, J.L. (2000). Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. *Anim. Genet.* 31, 306–309.

Spiller, M.P., Kambadur, R., Jeanplong, F., Thomas, M., Martyn, J.K., Bass, J.J., and Sharma, M. (2002). The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol. Cell. Biol.* 22, 7066–7082.

Stinckens, A., Luyten, T., Bijttebier, J., Van den Maagdenberg, K., Dieltiens, D., Janssens, S., De Smet, S., Georges, M., and Buys, N. (2008). Characterization of the complete porcine MSTN gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. *Anim. Genet.* 39, 586–596.

Storm, E.E., Huynh, T.V., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kingsley, D.M., and Lee, S.J. (1994). Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF beta-superfamily. *Nature* 368, 639–643.

T-

Tajbakhsh, S., and Spörle, R. (1998). Somite Development: Constructing the Vertebrate Body. *Cell* 92, 9–16.

Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., and Buckingham, M. (1997). Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89, 127–138.

Takeda, H., Charlier, C., Farnir, F., and Georges, M. (2010). Demonstrating polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vivo: application to the g+6223G->A mutation of Texel sheep. *RNA N. Y. N* 16, 1854–1863.

Tawil, R., van der Maarel, S.M., and Tapscott, S.J. (2014). Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skelet. Muscle* 4, 12.

Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Kull, F.C., and Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E221–E228.

Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 753–766.

Thomas, M., Langley, B., Berry, C., Sharma, M., Kirk, S., Bass, J., and Kambadur, R. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 40235–40243.

Tintignac, L.A., Leibovitch, M.P., Kitzmann, M., Fernandez, A., Ducommun, B., Meijer, L., and Leibovitch, S.A. (2000). Cyclin E-cdk2 phosphorylation promotes late G1-phase degradation of MyoD in muscle cells. *Exp. Cell Res.* 259, 300–307.

Tremblay, P., Dietrich, S., Mericskay, M., Schubert, F.R., Li, Z., and Paulin, D. (1998). A crucial role for Pax3 in the development of the hypaxial musculature and the long-range migration of muscle precursors. *Dev. Biol.* 203, 49–61.

Trendelenburg, A.U., Meyer, A., Rohner, D., Boyle, J., Hatakeyama, S., and Glass, D.J. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C1258–C1270.

Tyler, K.L. (2003). Origins and early descriptions of “Duchenne muscular dystrophy.” *Muscle Nerve* 28, 402–422.

U-

Uchiyama, K., Ishikawa, A., and Hanaoka, K. (2000). Expression of *lhx1* involved in the hypaxial musculature formation of the mouse embryo. *J. Exp. Zool.* 286, 270–279.

V-

Valle, G., Faulkner, G., De Antoni, A., Pacchioni, B., Pallavicini, A., Pandolfo, D., Tiso, N., Toppo, S., Trevisan, S., and Lanfranchi, G. (1997). Telethonin, a novel sarcomeric protein of heart and skeletal muscle. *FEBS Lett.* 415, 163–168.

Vandervoort, A.A. (2002). Aging of the human neuromuscular system. *Muscle Nerve* 25, 17–25.

Vissac, B., Menissier, F., Perreau, B., Manis, Y., and Marchand, H. (1973). Etude du caractère culard. VII. - Croissance et musculature des femelles, déséquilibre morphologique au vêlage. *Ann. Génétique Sélection Anim.* 5, 23–38.

Vissac, B., Perreau, B., Mauleon, P., Ménessier, F., Fontaubert, Y. de, Manis, Y., and Marchand, H. (1974). Étude du caractère culard. IX. – Fertilité des femelles et aptitude maternelle. *Genet. Sel. Evol.* 6, 1–13.

W-

Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N., and Lee, S.-J. (2002). Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in *mdx* mice. *Ann. Neurol.* 52, 832–836.

Wagner, K.R., Liu, X., Chang, X., and Allen, R.E. (2005). Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2519–2524.

Wagner, K.R., Fleckenstein, J.L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Bushby, K., Escolar, D.M., Flanigan, K.M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G.I., et al. (2008). A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 63, 561–571.

Wakelam, M.J. (1985). The fusion of myoblasts. *Biochem. J.* 228, 1–12.

Wang, J., and Walsh, K. (1996). Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273, 359–361.

Wang, Q., and McPherron, A.C. (2012). Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. *J. Physiol.* 590, 2151–2165.

Wang, H., Zhang, Q., and Zhu, D. (2003). hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 877–883.

Weber, A.D., and Ibsen, H.L. (1935). The Occurrence of the Double-Musclered Character in Purebred Beef Cattle. *J. Anim. Sci.* 1935, 228–232.

Whittemore, L.-A., Song, K., Li, X., Aghajanian, J., Davies, M., Girgenrath, S., Hill, J.J., Jalenak, M., Kelley, P., Knight, A., et al. (2003). Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 965–971.

Willoughby, D.S. (2004). Effects of an alleged myostatin-binding supplement and heavy resistance training on serum myostatin, muscle strength and mass, and body composition. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 14, 461–472.

Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J., and Kaufman, R.J. (1990). Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9378–9382.

Wolfman, N.M., McPherron, A.C., Pappano, W.N., Davies, M.V., Song, K., Tomkinson, K.N., Wright, J.F., Zhao, L., Sebald, S.M., Greenspan, D.S., et al. (2003). Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15842–15846.

Wriedt (1928). Die Vererbung des Doppellender-Charakters bei Rindern.

X-

Xing, F., Tan, X., Zhang, P.-J., Ma, J., Zhang, Y., Xu, P., and Xu, Y. (2007). Characterization of amphioxus GDF8/11 gene, an archetype of vertebrate MSTN and GDF11. *Dev. Genes Evol.* 217, 549–554.

Y-

Yang, J., Ratovitski, T., Brady, J.P., Solomon, M.B., Wells, K.D., and Wall, R.J. (2001). Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.* 60, 351–361.

Yang, T., Chen, X.L., Huang, Z.Q., Wen, W.X., Xu, M., Chen, D.W., Yu, B., He, J., Luo, J.Q., Yu, J., et al. (2014). MicroRNA-27a promotes porcine myoblast proliferation by downregulating myostatin expression. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 1–6.

Yang, W., Chen, Y., Zhang, Y., Wang, X., Yang, N., and Zhu, D. (2006). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res.* *66*, 1320–1326.

Yang, W., Zhang, Y., Li, Y., Wu, Z., and Zhu, D. (2007). Myostatin induces cyclin D1 degradation to cause cell cycle arrest through a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/GSK-3 beta pathway and is antagonized by insulin-like growth factor 1. *J. Biol. Chem.* *282*, 3799–3808.

Yasaka, N., Suzuki, K., Kishioka, Y., Wakamatsu, J., and Nishimura, T. (2013). Laminin binds to myostatin and attenuates its signaling. *Anim. Sci. J. Nihon Chikusan Gakkaiho* *84*, 663–668.

Z-

Zhang, C., Tan, C.K., McFarlane, C., Sharma, M., Tan, N.S., and Kambadur, R. (2012a). Myostatin-null mice exhibit delayed skin wound healing through the blockade of transforming growth factor- β signaling by decorin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *302*, C1213–C1225.

Zhang, T., Yang, H., Wang, R., Xu, K., Xin, Y., Ren, G., Zhou, G., Zhang, C., Wang, L., and Zhang, Z. (2011). Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice. *Vaccine* *29*, 8412–8416.

Zhang, T., Sun, L., Xin, Y., Ma, L., Zhang, Y., Wang, X., Xu, K., Ren, C., Zhang, C., Chen, Z., et al. (2012b). A vaccine grade of yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian myostatin. *BMC Biotechnol.* *12*, 97.

Zhu, X., Hadhazy, M., Wehling, M., Tidball, J.G., and McNally, E.M. (2000). Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. *FEBS Lett.* *474*, 71–75.

Zhu, X., Topouzis, S., Liang, L.-F., and Stotish, R.L. (2004). Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* *26*, 262–272.

Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M., and Lee, S.-J. (2002). Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* *296*, 1486–1488.

Zubrzycka-Gaarn, E.E., Bulman, D.E., Karpati, G., Burghes, A.H., Belfall, B., Klamut, H.J., Talbot, J., Hodges, R.S., Ray, P.N., and Worton, R.G. (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* *333*, 466–469.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Résultats de génotypage des animaux provenant des croisements Blonde d'Aquitaine x Prim'Holstein

n° d'échantillon	Génération	RACE	Génotype
A01	F0	79	G/G
A02	F1	39	G/T
A03	F2	39	G/T
A04	F2	39	G/T
A05	F2	39	G/T
A06	F2	39	G/T
A07	F2	39	T/T
A08	F2	39	T/T
A09	BC	39	T/T
A10	BC	39	G/T
B01	F0	79	G/G
B02	F1	39	G/T
B03	F2	39	G/G
B04	F2	39	G/T
B05	F2	39	G/T
B06	F2	39	G/T
B07	F2	39	G/T
B08	F2	39	G/G
B09	BC	39	T/T
B10	BC	39	T/T
C01	F0	79	G/G
C02	F1	39	G/T
C03	F2	39	G/T
C04	F2	39	T/T
C05	F2	39	G/T
C06	F2	39	T/T
C07	F2	39	G/T
C08	F2	39	G/G

n° d'échantillon	Génération	RACE	Génotype
C09	BC	39	T/T
C10	BC	39	G/T
D01	F1	39	G/T
D02	F1	39	G/T
D03	F2	39	T/T
D04	F2	39	T/T
D05	F2	39	G/T
D06	F2	39	G/G
D07	F2	39	G/G
D08	F2	39	G/T
D09	BC	39	G/T
E01	F1	39	G/T
E02	F1	39	G/T
E03	F2	39	G/T
E04	F2	39	G/T
E05	F2	39	G/T
E06	F2	39	G/T
E07	F2	39	-
E08	F2	39	G/G
E09	BC	39	T/T
E10	F1	39	G/T
F01	F1	39	-
F02	F1	39	G/T
F03	F2	39	G/G
F04	F2	39	G/T
F05	F2	39	G/G
F06	F2	39	G/T
F07	F2	39	G/T

**Annexe 1 (suite et fin) : Résultats de génotypage des animaux provenant des croisements
Blonde d'Aquitaine x Prim'Holstein**

n° d'échantillon	Génération	RACE	Génotype
F08	F2	39	G/T
F09	BC	39	T/T
F10	F1	39	G/T
G01	F1	39	G/T
G02	F2	39	G/T
G03	F2	39	G/G
G04	F2	39	G/T
G05	F2	39	T/T
G06	F2	39	G/G
G07	BC	39	G/T
G08	F2	39	G/G
G09	BC	39	T/T
G10	-	39	G/T
H01	F1	39	G/T
H02	F2	39	T/T
H03	F2	39	T/T
H04	F2	39	G/T
H05	F2	39	T/T
H06	F2	39	G/T
H07	F2	39	G/T
H08	BC	39	G/T
H09	BC	39	T/T
H10	-	39	G/T

Annexe 2 : Séquences codantes des transcrits 1 et 2 (cf. Fig. 36)

Transcrit 1	ATG	CAAAA	ACTG	CAAAT	C	TCTG	TTT	TATTT	ACCT	ATTT	ATG	CTG	ATT	GTT	GCT	GG	CCCA	60	
Transcrit 2	ATG	CAAAA	ACTG	CAAAT	C	TCTG	TTT	TATTT	ACCT	ATTT	ATG	CTG	ATT	GTT	GCT	GG	CCCA	60	
Référence	ATG	CAAAA	ACTG	CAAAT	C	TCTG	TTT	TATTT	ACCT	ATTT	ATG	CTG	ATT	GTT	GCT	GG	CCCA	60	

Transcrit 1	GT	GATC	TGA	ATG	A	AC	AG	C	G	C	G	A	A	G	G	A	A	A	120
Transcrit 2	GT	GATC	TGA	ATG	A	AC	AG	C	G	C	G	A	A	G	G	A	A	A	120
Référence	GT	GATC	TGA	ATG	A	AC	AG	C	G	C	G	A	A	G	G	A	A	A	120

Transcrit 1	GC	ATG	TTT	GT	G	A	G	G	G	A	A	A	A	C	A	C	T	A	180
Transcrit 2	GC	ATG	TTT	GT	G	A	G	G	G	A	A	A	A	C	A	C	T	A	180
Référence	GC	ATG	TTT	GT	G	A	G	G	G	A	A	A	A	C	A	C	T	A	180

Transcrit 1	CT	C	A	G	T	A	A	A	C	T	T	C	G	C	T	G	A	A	240
Transcrit 2	CT	C	A	G	T	A	A	A	C	T	T	C	G	C	T	G	A	A	240
Référence	CT	C	A	G	T	A	A	A	C	T	T	C	G	C	T	G	A	A	240

Transcrit 1	TT	G	C	C	A	A	G	G	T	C	C	T	C	C	A	C	T	C	300
Transcrit 2	TT	G	C	C	A	A	G	G	T	C	C	T	C	C	A	C	T	C	300
Référence	TT	G	C	C	A	A	G	G	T	C	C	T	C	C	A	C	T	C	300

Transcrit 1	A	G	C	A	G	T	G	A	C	G	G	T	C	C	T	T	G	A	360
Transcrit 2	A	G	C	A	G	T	G	A	C	G	G	T	C	C	T	T	G	A	360
Référence	A	G	C	A	G	T	G	A	C	G	G	T	C	C	T	T	G	A	360
**																			
Transcrit 1	AT	G	C	C	A	C	G	G	A	G	T	C	T	G	A	T	C	T	420
Transcrit 2	AT	G	C	C	A	C	G	G	A	G	T	C	T	G	A	T	C	T	420
Référence	AT	G	C	C	A	C	G	G	A	G	T	C	T	G	A	T	C	T	420

Transcrit 1	AA	A	T	T	A	G	C	T	C	T	A	A	G	A	T	A	C	A	480
Transcrit 2	AA	A	T	T	A	G	C	T	C	T	A	A	G	A	T	A	C	A	480
Référence	AA	A	T	T	A	G	C	T	C	T	A	A	G	A	T	A	C	A	480

Transcrit 1	A	G	G	C	T	G	T	C	A	A	G	A	C	T	C	T	G	C	540
Transcrit 2	A	G	G	C	T	G	T	C	A	A	G	A	C	T	C	T	G	C	540
Référence	A	G	G	C	T	G	T	C	A	A	G	A	C	T	C	T	G	C	540

Transcrit 1	AA	A	G	A	C	G	G	T	A	C	A	A	G	T	A	C	T	G	600
Transcrit 2	AA	A	G	A	C	G	G	T	A	C	A	A	G	T	A	C	T	G	600
Référence	AA	A	G	A	C	G	G	T	A	C	A	A	G	T	A	C	T	G	600

Transcrit 1	G	G	T	A	T	T	G	C	A	G	A	C	A	T	T	G	A	A	660
Transcrit 2	G	G	T	A	T	T	G	C	A	G	A	C	A	T	T	G	A	A	660
Référence	G	G	T	A	T	T	G	C	A	G	A	C	A	T	T	G	A	A	660

Transcrit 1	T	C	C	A	C	T	T	A	G	C	A	T	T	G	A	A	T	C	720
Transcrit 2	T	C	C	A	C	T	T	A	G	C	A	T	T	G	A	A	T	C	720
Référence	T	C	C	A	C	T	T	A	G	C	A	T	T	G	A	A	T	C	720

Transcrit 1	T	T	C	C	A	G	A	A	C	C	A	G	A	A	G	A	T	G	747

Exon 4 (transcrit 2)

```

Transcrit 2      TTCCCAGAACCAGGAGAAGATGGACTGACTCCTTTTTTAGAAGTCAAG----- 768
Référence       TTCCCAGAACCAGGAGAAGATGGACTGACTCCTTTTTTAGAAGTCAAGGTAACAGACACA 780
                *****

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       CCAAAAAGATCTAGGAGAGATTTTGGGCTTGATTGTGATGAACACTCCACAGAACTCGA 840

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       TGCTGTCGTTACCCTCTAACTGTGGATTTTGAAGCTTTTGGATGGGATTGGATTATTGCA 900

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       CCTAAAAGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATGTGAATTTGTATTTTGCAAAAG 960

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       TATCCTCATACCCATCTTGTGCACCAAGCAAACCCAGAGGTTTCAGCCGGCCCTGCTGT 1020

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       ACTCCTACAAAAGATGTCTCCAATTAATATGCTATATTTTAATGGCGAAGGACAAATAATA 1080

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       TACGGGAAGATTCCAGCCATGGTAGTAGATCGCTGTGGGTGTTCATCAGGTCATATTTG 1140

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       GTTCATAGCTTCCCTCAAACATGGAAGTCTTCCCCTCAACAATTTTGAACTGTGAAATT 1200

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       ATGTACCACAGGCTATAAGCCTAGAGTATGCTACAGTCACTTAAGCACAAGCTACAGTAT 1260

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       ATGAGCTAAAAAGAGAGAATATATGCAATGGTTGGCATTTAACCATCCAACAAATCGTA 1320

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       TAATAAAAAGTTTTATGATTTCCAGAGTTTTTGAAGTACTAGGAGATCAAATTCATTTATGT 1380

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       TGAAATATATTACAACACATGCAGGTGAATGAAAGCAATTCCTTGTCTTCTGGTGAAT 1440

Transcrit 1      -----
Transcrit 2      -----
Référence       TAAAGGAGTATGCTTTAAAATCTATTTCTCTACAGTTTCACTTAATATTTACAGAAAAAT 1500

Transcrit 1      -----

```


Transcrit 2 -----
Référence CTATATGTAGTATTGGTAAAATGCAGTATTGTTATATACCATTATTTGAAACATCCTTAA 1560

Transcrit 1 -----
Transcrit 2 -----
Référence ACACTTGAATTTATATTGTATGATAGCATACTTGGTAAGATGAGATTCCACAAAGTAGGG 1620

Transcrit 1 -----
Transcrit 2 -----
Référence ATGGCACACCATACGCAGGTTACCATTCTATACTGATTGATACAGTACATTAACAGTTT 1680

Transcrit 1 -----
Transcrit 2 -----
Référence TTGCCAATGGTGCTAATAACAATAGGCTGAATGGCTGATGTTATCAGGTTTATCAAGCAA 1740

Transcrit 1 -----GTGCATTTTCACACTCCTCCCT 769
Transcrit 2 -----GTGCATTTTCACACTCCTCCCT 790
Référence AAACATTTCAGGAAAGTAATAAGTTTCTCCTTTCTCAGGTGCATTTTCACACTCCTCCCT 1800

Transcrit 1 ATGGGCAATGGATGTTCTATAGAGAAAGAAAACCTATTCTCCTAGAGGCTACATTCAAT 829
Transcrit 2 ATGGGCAATGGATGTTCTATAGAGAAAGAAAACCTATTCTCCTAGAGGCTACATTCAAT 850
Référence ATGGGCAATGGATGTTCTATAGAGAAAGAAAACCTATTTCTCCTAGAGGCTACATTCAAT 1860

Transcrit 1 TCTGTAGCATACTTGGAGAAGCTGCATTGAAAAGGCAGTCAAAAAGTATTTCATTTTGGTC 889
Transcrit 2 TCTGTAGCATACTTGGAGAAGCTGCATTGAAAAGGCAGTCAAAAAGTATTTCATTTTGGTC 910
Référence TCTGTAGCATACTTGGAGAAGCTGCATTGAAAAGGCAGTCAAAAAGTATTTCATTTTGGTC 1920

Transcrit 1 AAAATTTCAAATTTATAGCCTGCCTTTGCAATACTGCAGCTTTTAGGATGAAATGGA 949
Transcrit 2 AAAATTTCAAATTTATAGCCTGCCTTTGCAATACTGCAGCTTTTAGGATGAAATGGA 970
Référence AAAATTTCAAATTTATAGCCTGCCTTTGCAATACTGCAGCTTTTAGGATGAAATAATGGA 1980

Transcrit 1 AATGACTGATTCTATCAATATTGTATAAAAAGATTTTGAAATAGTTGCATTTATATAATA 1009
Transcrit 2 AATGACTGATTCTATCAATATTGTATAAAAAGATTTTGAAATAGTTGCATTTATATAATA 1030
Référence AATGACTGATTCTATCAATATTGTATAAAAAGATTTTGAAATAGTTGCATTTATATAATA 2040

Transcrit 1 TGTATACAATATTGTTTTGTAAATAAATGTCTCCTTTTTTATTTACTTTGGTATATTTTT 1069
Transcrit 2 TGTATACAATATTGTTTTGTAAATAAATGTCTCCTTTTTTATTTACTTTGGTATATTTTTA 1090
Référence TGTATACAATATTGTTTTGTAAATAAATGTCTCCTTTTTTATTTACTT-GGTATATTTTT 2099

Transcrit 1 ACAGTAAGGACATTTCAAATTAAGTATTAAGGCACAAAGACATGTCATGTAGGACATAAA 1129
Transcrit 2 ACAGTAAGGACATTTCAAATTAAGTATTAAGGCACAAAGACATGTCATGTAGGACATAAA 1150
Référence ACAGTAAGGACATTTCAAATTAAGTATTAAGGCACAAAGACATGTCATGTAGGACATAAA 2159

Transcrit 1 AGCAAAAGCCTATATTTTGGAGCAAATAGTTGATTAAATAGTGGTCTTAAACTCCATA 1189
Transcrit 2 AGCAAAAGCCTATATTTTGGAGCAAATAGTTGATTAAATAGTGGTCTTAAACTCCATA 1210
Référence AGCAAAAGCCTATATTTTGGAGCAAATAGTTGATTAAATAGTGGTCTTAAACTCCATA 2219

Transcrit 1 TGCTAATGGTTAGATGGTTATATTACAATCATTTTATATTTTTTACATTATTAGCATT 1249
Transcrit 2 TGCTAATGGTTAGATGGTTATATTACAATCATTTTATATTTTTTACATTATTAGCATT 1270
Référence TGCTAATGGTTAGATGGTTATATTACAATCATTTTATATTTTTTACATTATTAGCATT 2279

Transcrit 1 ACTTATGGATTTCATGATGGCTGTATAAATGTGAATGTGAAATTTCAATGGTTTACTGTCAT 1309

Transcrit 2 ACTTATGGATTCATGATGGCTGTATAATGTGAATGTGAAATTTCAATGGTTTACTGTCAT 1330
 Référence ACTTATGGATTCATGATGGCTGTATAATGTGAATGTGAAATTTCAATGGTTTACTGTCAT 2339

Transcrit 1 TGTATTCAAATCT----- 1322
 Transcrit 2 TGTATTCAAATCT----- 1343
 Référence TGTATTCAAATCTCAACGTTCCATTATTTAATACTTATAAATATTAAGCATAACCAAAT 2399

Transcrit 1 -----
 Transcrit 2 -----
 Référence GATTTAACTCTATTATCTGAAATCAGAATAATAAACTGATGATATCTTACAAATTGTTAA 2459

Transcrit 1 -----
 Transcrit 2 -----
 Référence TTTTATTTTATAATTTGATAATGAATATATTTCTGCATATATTTACTACTATTTTGTA 2519

Transcrit 1 -----
 Transcrit 2 -----
 Référence TCAGGATTTTGTTAATCAAATAAATTGAACTTATGATTAAGTGAATTATTTCTTACATC 2579

Transcrit 1 -----
 Transcrit 2 -----
 Référence CAATGTGTAGAAACAATTTAAGTTATATTAAGTGTTTTTCACCTTTTTTGAAAGA 2634

Résumé

La myostatine, un membre de la superfamille TGF- β (*Transforming growth factor-beta*) est un régulateur négatif de la croissance et du développement musculaire.

Depuis sa découverte en 1997, le gène *myostatine* a été intensément étudié de par ses applications potentielles bénéfiques dans les domaines de l'élevage et médical. Les mutations pertes de fonctions qui affectent la fonction de la myostatine ou celles qui réduisent son expression conduisent à une hypertrophie musculaire, alors que celle qui engendre une surexpression de la myostatine engendre une réduction importante de la masse musculaire.

Nous avons identifié un allèle inattendu du gène *myostatine* qui est responsable de l'augmentation de la masse musculaire chez la race bovine Blonde d'Aquitaine. Dans le muscle, cet allèle est fortement exprimé conduisant à la formation d'un transcrit *myostatine* aberrant avec un codon STOP prématuré de la traduction en plus d'une quantité résiduelle correctement épissé. Ce profil d'expression qui résulte d'une mutation intronique *leaky* par rapport à l'activité du spliceosome, contribue à l'établissement d'une hypertrophie modérée qui caractérise la race bovine Blonde d'Aquitaine. Cette découverte est importante dans le domaine de la génétique de l'élevage et potentiellement dans le domaine médical. Elle permet de concilier à la fois le bien être de l'animal et la production qualitative et quantitative de la viande. Par ailleurs, le mécanisme est susceptible d'être exploité pour une possible application pour soigner certaines maladies musculaires humaines *via* une manipulation appropriée des pré-ARNm du gène *myostatine*.

Abstract

Myostatin, a member of the TGF- β (Transforming growth factor-beta) superfamily, functions as a negative regulator of skeletal muscle development and growth.

Since its discovery in mice in 1997, the *myostatin* gene has been extensively investigated considering the potential benefits of enhancing muscle growth in clinical and agricultural settings. Loss-of-function mutations which impair myostatin function or those which knockdown *myostatin* gene expression, result in muscle hypertrophy often referred to as "double-muscling" whereas myostatin overexpression induces profound muscle loss.

Here, we identified an unexpected mutation in the *myostatin* gene that is responsible for increasing muscle mass in Blonde d'Aquitaine cattle breed. In skeletal muscle, the mutant allele was highly expressed leading to an abnormal transcript with a premature termination codon and to residual levels of a correctly spliced transcript. This expression pattern, caused by a leaky intronic mutation with regard to spliceosome, could contribute to the moderate muscle hypertrophy in this cattle breed. This finding is of importance for genetic counseling for meat quantity and quality in livestock production and possibly to manipulate *myostatin* pre-mRNA in human muscle diseases.

Résumé

La myostatine, un membre de la superfamille TGF- β (*Transforming growth factor-beta*) est un régulateur négatif de la croissance et du développement musculaire.

Depuis sa découverte en 1997, le gène *myostatine* a été intensément étudié de par ses applications potentielles bénéfiques dans les domaines de l'élevage et médical. Les mutations pertes de fonctions qui affectent la fonction de la myostatine ou celles qui réduisent son expression conduisent à une hypertrophie musculaire, alors que celle qui engendre une surexpression de la myostatine engendre une réduction importante de la masse musculaire.

Nous avons identifié un allèle inattendu du gène *myostatine* qui est responsable de l'augmentation de la masse musculaire chez la race bovine Blonde d'Aquitaine. Dans le muscle, cet allèle est fortement exprimé conduisant à la formation d'un transcrit *myostatine* aberrant avec un codon STOP prématuré de la traduction en plus d'une quantité résiduelle correctement épissée. Ce profil d'expression qui résulte d'une mutation intronique *leaky* par rapport à l'activité du spliceosome, contribue à l'établissement d'une hypertrophie modérée qui caractérise la race bovine Blonde d'Aquitaine. Cette découverte est importante dans le domaine de la génétique de l'élevage et potentiellement dans le domaine médical. Elle permet de concilier à la fois le bien être de l'animal et la production qualitative et quantitative de la viande. Par ailleurs, le mécanisme est susceptible d'être exploité pour une possible application pour soigner certaines maladies musculaires humaines *via* une manipulation appropriée des pré-ARNm du gène *myostatine*.

Abstract

Myostatin, a member of the TGF- β (Transforming growth factor-beta) superfamily, functions as a negative regulator of skeletal muscle development and growth.

Since its discovery in mice in 1997, the *myostatin* gene has been extensively investigated considering the potential benefits of enhancing muscle growth in clinical and agricultural settings. Loss-of-function mutations which impair myostatin function or those which knockdown *myostatin* gene expression, result in muscle hypertrophy often referred to as "double-muscling" whereas myostatin overexpression induces profound muscle loss.

Here, we identified an unexpected mutation in the *myostatin* gene that is responsible for increasing muscle mass in Blonde d'Aquitaine cattle breed. In skeletal muscle, the mutant allele was highly expressed leading to an abnormal transcript with a premature termination codon and to residual levels of a correctly spliced transcript. This expression pattern, caused by a leaky intronic mutation with regard to spliceosome, could contribute to the moderate muscle hypertrophy in this cattle breed. This finding is of importance for genetic counseling for meat quantity and quality in livestock production and possibly to manipulate *myostatin* pre-mRNA in human muscle diseases.