

Clonage positionnel et ingénierie génétique de la myostatine, le gène responsable du caractère culard chez les bovins

PIROTTIN D. ¹, GROBET L. ², GEORGES M. ¹

¹ Unité de Génomique Animale, Département des Productions Animales, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, B43, 20 Bld de Colonster, 4000 Liège, Belgique.

² Service d'Histologie et Embryologie, Département de Morphologie et Pathologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, B43, 20 Bld de Colonster, 4000 Liège, Belgique.

Projet de recherche financé par le Ministère fédéral de l'Agriculture et des Classes moyennes et par le Ministère wallon de l'Agriculture.

Correspondance : Michel Georges - michel.georges@ulg.ac.be

RESUME : Le caractère culard chez le bovin est une augmentation généralisée de la masse des muscles squelettiques faisant suite à une hyperplasie des fibres musculaires. En utilisant des méthodes classiques de clonage positionnel, nous avons démontré que le caractère culard du bovin est dû à des mutations induisant une perte de fonction de la myostatine, un membre de la superfamille des facteurs de croissance et de différenciation de type TGF- β . Les outils de ciblage et d'inactivation conditionnelle de gènes chez la souris nous ont ensuite permis de montrer que l'inactivation postnatale et muscle-spécifique de la myostatine suffisait à induire une hypertrophie musculaire comparable à celle observée lors de l'inactivation constitutive du même gène, ouvrant ainsi la porte à l'utilisation d'inhibiteurs de la myostatine chez l'adulte, tant dans le domaine des productions animales qu'en médecine humaine. Enfin, en insérant un transinhibiteur de la myostatine sur le chromosome Y, nous avons montré en modèle murin la faisabilité d'un nouveau mode d'élevage bovin où les caractères viandeux et laitiers ségrégeraient au sein d'une même race, respectivement chez les mâles et les femelles.

1. Description du caractère culard chez le bovin

Depuis sa première description il y a maintenant presque 200 ans (Culley, 1807), le caractère culard, une augmentation généralisée de la masse des muscles squelettiques chez le bovin (voir ANNEXE 1 : Eléments de myogenèse chez les vertébrés), a été observé régulièrement dans plusieurs races bovines partout dans le monde (Ménissier, 1982). Selon le contexte, il est tantôt considéré comme une tare congénitale, tantôt comme un caractère économiquement avantageux. C'est dans la race Blanc Bleu Belge (BBB) que ce caractère a probablement été le plus intensivement sélectionné, raison pour laquelle il y est fixé depuis un certain nombre d'années, bien qu'une

amélioration des aptitudes musculaires continue à y être observée.

Les bovins culards diffèrent anatomiquement, physiologiquement et biochimiquement de leurs congénères conventionnels. La différence anatomique la plus notable est évidemment l'augmentation de la masse musculaire, qui est la plus spectaculaire au niveau de la région proximale des membres: 20,75 % pour les quartiers avants (8,37 à 51,39 % pour les muscles individuels), 22,7 % pour les quartiers arrières (9,14 à 33,8 % pour les muscles individuels) et 18,7 % pour le mono-costal (septième côte) (Ansay et Hanset, 1979). Cette augmentation de la masse musculaire est due à une augmentation du nombre de fibres musculaires (hyperplasie) et non à une augmentation de leur taille (hypertro-

phie). Une étude faite sur le muscle semi-tendineux de quatre races bovines montre que ce muscle contient deux fois plus de fibres musculaires chez le BBB que chez les trois autres races étudiées (German Angus, Galloway et Holstein-Friesian). L'augmentation du nombre de fibres est due exclusivement à une augmentation du nombre de fibres de type IIB (fibres rapides glycolytiques), les nombres de fibres de type I et IIA étant inchangés, voire légèrement inférieurs (Wegner *et al.*, 2000). La plus grande proportion de fibres IIB, dites « blanches », pourrait d'ailleurs expliquer la pâleur de la viande issue des bovins BBB par rapport aux autres races.

Cette augmentation de la masse musculaire est accompagnée d'une réduction de la masse de tous les autres

organes étudiés : la peau (19,75 %), les os (de 2,86 à 9,59 %), la graisse (21,48 % pour la graisse péri-rénale) et les organes internes (de 9,84 % pour les glandes surrénales à 51,08 % pour le thymus) (Ansay et Hanset, 1979). Une réduction des dimensions de la carcasse (longueur de carcasse, profondeur de la poitrine, hauteur et largeur du bassin) est également observée.

Les différences remarquées sur les plans physiologique et biochimique sont (i) une diminution de la créatine plasmatique et musculaire (au niveau des muscles *longissimus dorsi*, *latissimus dorsi* et *pectoralis profundis*) et une augmentation de la créatinine plasmatique chez les culards (Ansay et Hanset, 1979 ; Hanset et Michaux, 1982), (ii) une diminution de l'hématocrite chez les culards (Ansay et Hanset, 1979), (iii) une diminution des taux plasmatiques de LH et de testostérone chez les culards jusqu'à l'âge de un an (puberté retardée) ainsi qu'une diminution de l'insuline plasmatique chez ces mêmes culards, persistante à un an (Michaux *et al.*, 1982), (iv) une diminution des taux musculaires en hydroxyproline (révélateur d'une diminution de la trame conjonctive avec pour conséquence une plus grande tendreté de la viande) et en lipides totaux (Hanset *et al.*, 1982) et (v) un meilleur indice de conversion alimentaire.

Globalement, ces caractéristiques rendent la race économiquement plus rentable par rapport à une race conventionnelle et ce malgré une série d'inconvénients parmi lesquels il faut citer une réduction de la production laitière ainsi que de la fertilité chez les femelles, une plus grande susceptibilité aux maladies respiratoires, probablement secondaire à la réduction relative de la taille des poumons (Gustín, 1989), et surtout un recours quasi systématique à la césarienne en raison non seulement de la conformation du veau mais aussi d'une réduction de la taille de la filière pelvienne chez la mère.

2. Le locus *mh*

Bien que le déterminisme héréditaire du caractère culard chez le bovin ait été rapidement envisagé, le mode de ségrégation est longtemps resté controversé : monogénique ou polygénique, dominant ou récessif.

En 1985, Hanset et Michaux, afin d'élucider le mode de ségrégation du

caractère culard chez le bovin BBB, utilisent d'une part un pedigree expérimental généré par le croisement en retour de femelles F1 (BBB X Holstein) avec des mâles BBB et d'autre part une appréciation purement quantitative et donc plus objective du phénotype (le poids cumulé des muscles les plus importants — représentant 75% du poids total des muscles — de veaux abattus au poids constant de 84 kg). La ségrégation clairement bimodale du caractère, un écart entre les deux groupes supérieur à quatre fois la déviation standard propre à chaque groupe et le faible écart existant entre les « hétérozygotes » et les bovins conventionnels plaident alors fortement en faveur d'un gène majeur autosomal, caractérisé par un allèle sauvage « + » et un allèle « *mh* » partiellement récessif (Hanset et Michaux, 1985a). Ces résultats furent confirmés dans la population BBB commerciale issue de l'insémination artificielle (Hanset et Michaux, 1985b).

La localisation sub-chromosomique du locus *mh* fut ensuite déterminée par des études de liaison génétique au moyen de 213 marqueurs microsatellites et d'un pedigree expérimental obtenu par croisement en retour d'individus F1 (Holstein X BBB) avec des individus BBB culards. Le locus *mh* fut localisé sur l'extrémité subcentromérique du chromosome deux bovin à deux cM du marqueur microsatellite le plus proche (Charlier *et al.*, 1995) (voir ANNEXE 2 : Principes du clonage positionnel d'un caractère monogénique).

3. Le gène myostatine

Le processus de localisation du gène *mh* s'est poursuivi par la construction d'un *contig* de YACs (*Yeast Artificial Chromosome*) couvrant la région préalablement définie par études de liaison génétique (Pirottin *et al.*, 1999). Dans le même temps, un candidat positionnel prometteur a été décrit sous la forme d'un nouveau membre de la superfamille des facteurs de croissance et de différenciation de type TGF β (voir ANNEXE 3 : La superfamille des TGF β) nommé GDF8 puis myostatine (« inhibiteur du développement musculaire ») en raison de l'augmentation spectaculaire et généralisée de la masse des muscles squelettiques consécutive à son invalidation chez la souris (McPherron *et al.*, 1997). Après avoir démontré que l'orthologue bovin de la myostatine colocalisait avec

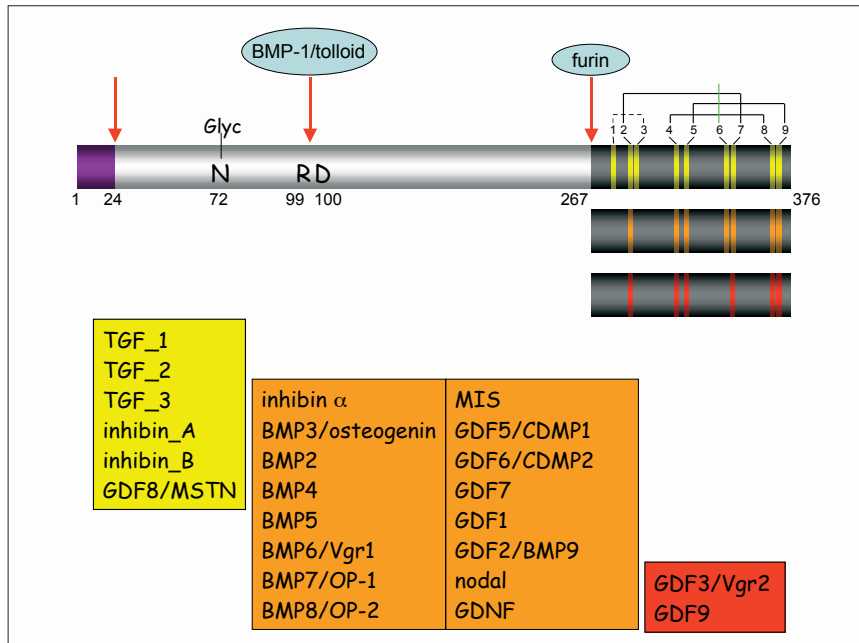
le locus *mh*, notre laboratoire ainsi que d'autres ont décrit une série allélique de mutations entraînant une perte de fonction de la myostatine dans plusieurs races bovines européennes connues pour leur caractère hypermusclé (Grobet *et al.*, 1997 ; Grobet *et al.*, 1998 ; McPherron et Lee, 1997 ; Kambadur *et al.*, 1997 ; Marchitelli *et al.*, 2003).

Comme les autres membres de la famille des TGF β , la myostatine est synthétisée sous la forme d'une préproprotéine qui, en vue de libérer le peptide biologiquement actif, subit 2 clivages protéolytiques. Le premier retire un peptide signal de 24 acides aminés. Le second, visant un site de clivage dibasique RSRR, est médié *in vitro* par une sérine protéase appelée furine. Ce clivage génère un propeptide aminoterminal N-glycosylé (appelé LAP, *Latency Associated Peptide*, chez TGF β) et un domaine carboxyterminal qui, sous la forme d'un homodimère, est le ligand biologiquement actif (Figure 1). Ce domaine carboxyterminal est caractérisé par neuf cystéines conservées (Figure 1), dont six forment trois ponts disulfures intramoléculaires conférant une structure tridimensionnelle caractéristique des TGF β appelée « nœud de cystéines ». Une des cystéines forme un pont disulfure intermoléculaire participant à l'homodimérisation.

Le domaine carboxyterminal est extraordinairement bien conservé dans toutes les espèces de vertébrés chez qui il a été identifié (McPherron et Lee, 1997) : la séquence protéique est parfaitement identique chez l'homme, la souris, le rat, le porc, le poulet et la dinde, et ne comporte que une à trois différences chez le babouin, le bovin et le mouton.

Le transcrit myostatine est détecté dans le myotome (voir ANNEXE 1 : Eléments de myogenèse chez les vertébrés) dès neuf jours et demi de gestation chez la souris. Chez l'adulte, il est essentiellement confiné au muscle squelettique, bien que de faibles taux d'expression aient été décrits dans le tissu adipeux de la souris (McPherron *et al.*, 1997), le cœur de la souris et du mouton (Sharma *et al.*, 1999) et la glande mammaire de la truie (Ji *et al.*, 1998). Contrairement à son mode d'expression assez simple, la régulation post-traductionnelle de la myostatine semble assez complexe. Premièrement, il a été montré que l'homodimère biologiquement actif circule dans le sérum sous une forme latente, en raison de sa liaison avec le propeptide (qui reste non covalentiellement lié après le clivage du site dibasique RSRR) (Lee et McPherron, 2001 ; Thies *et al.*, 2001 ;

Figure 1 : Synthèse, processing et structure de la myostatine, un membre de la superfamille des TGF β .



La myostatine est synthétisée sous la forme d'une préproprotéine de 376 acides aminés subissant trois clivages protéolytiques (flèches rouges). Le premier clivage élimine un peptide signal de 24 acides aminés (en mauve). Le deuxième clivage protéolytique, médié *in vitro* par une protéase appelée furine, sépare le propeptide aminoterminal (en gris clair), N-glycosylé (N-Glyc), du domaine carboxyterminal (en gris foncé). Ce dernier reste lié au propeptide de manière non covalente jusqu'à ce qu'un troisième clivage protéolytique, médié par une métalloprotéinase de la famille BMP-1/tolloid, clive le propeptide et déstabilise le complexe, aboutissant à la libération du peptide carboxyterminal. Les domaines carboxyterminaux des membres de la superfamille des TGF β contiennent six (rouge), sept (orange) ou neuf (jaune) cystéines conservées. Les six cystéines conservées entre tous les membres de la superfamille (cystéines 2, 4, 5, 7, 8 et 9) forment trois ponts disulfures intramoléculeux (lignes noires), conférant à la protéine une structure tridimensionnelle caractéristique des TGF β appelée « nœud de cystéines ». Les cystéines 1 et 3 forment un lien intramoléculeux supplémentaire (ligne pointillée) et la cystéine 6 forme un pont disulfure intermoléculeux (ligne verte) qui renforce les liens hydrophobes donnant naissance à l'homodimère carboxyterminal biologiquement actif.

Hill *et al.*, 2002 ; Wolfman *et al.*, 2003), FLRG (Follistatin Related Gene) (Hill *et al.*, 2002) et GASP1 (GDF Associated Serum Protein 1), une protéine contenant un motif *follistatin-like* et plusieurs motifs anti-protéase (Hill *et al.*, 2003). Bien qu'on ne sache pas si la myostatine circule sous la forme d'un complexe latent incluant toutes ces protéines ou sous la forme de plusieurs complexes différents avec une seule de ces protéines, il a par contre été démontré qu'un clivage du propeptide par une protéase de la famille BMP-1/tolloid entre les résidus arginine 75 et aspartate 76 déstabilise le complexe latent, permettant ainsi la libération du peptide actif (Wolfman *et al.*, 2003) (Figure 1). Deuxièmement, plusieurs études montrent que la follistatine est également capable de se lier *in vitro* à la myostatine et d'en inhiber les effets biologiques *in vitro* et *in vivo* (Lee et McPherron, 2001 ; Zimmers *et al.*, 2002 ; Anthor *et al.*, 2004). Troisièmement, il a été montré que le processing de la myostatine, c'est-à-dire le clivage du site RSRR, était régulé au cours du développement embryonnaire chez le bovin,

peut-être en raison d'un effet négatif de la myostatine sur l'expression de la protéase furine (McFarlane *et al.*, 2005).

In vitro, la myostatine se lie aux récepteurs activine de type IIA et IIB (ActRIIA et B) (Lee et McPherron, 2001) ainsi qu'aux récepteurs de type I ALK-4 et ALK-5 (Rebbapragada *et al.*, 2003), activant ainsi une cascade de phosphorylations intracellulaires liée aux protéines Smads (Thies *et al.*, 2001 ; Langley *et al.*, 2002 ; Rebbapragada *et al.*, 2003) qui aboutit à la régulation de l'expression des gènes cibles (voir ANNEXE 3 : La superfamille des TGF β). En culture de cellules C2C12 et de myoblastes bovins, la myostatine a pour effet d'inhiber la prolifération (Thomas *et al.*, 2000 ; Rios *et al.*, 2001 ; Taylor *et al.*, 2001 ; Joulia *et al.*, 2003) ainsi que la différenciation (Langley *et al.*, 2002 ; Rios *et al.*, 2002 ; Joulia *et al.*, 2003) des myoblastes. L'effet antiprolifératif est médié par une augmentation de p21 concomitante à une diminution de cdk2, avec pour conséquences une hypophosphorylation de Rb et un blocage du cycle cellulaire en phase G1. L'effet sur

la différenciation est consécutif à une diminution de l'expression de MyoD, Myf5 et myogenin. Outre son effet sur les myoblastes, il a été démontré que la myostatine induisait une diminution de la synthèse protéique dans les myotubes (Taylor *et al.*, 2001) ainsi qu'une inhibition de l'activation et du renouvellement des cellules satellites (McCroskery *et al.*, 2003), ce qui pourrait expliquer les effets observés suite à l'hyperactivation (Zimmers *et al.*, 2002) ou l'inactivation génique (Grobet *et al.*, 2003) ou pharmacologique (Bogdanovich *et al.*, 2002 ; Whittemore *et al.*, 2003 ; Wolfman *et al.*, 2003 ; Bogdanovich *et al.*, 2005) de la myostatine chez l'adulte.

Au début des années '60, Bullough a postulé, sans pouvoir la démontrer, l'existence des chalones : des facteurs circulants sécrétés par les tissus et limitant leur croissance (Bullough, 1962 ; 1965). La découverte de la myostatine, un facteur exprimé dans le muscle squelettique puis sécrété dans le sérum et exerçant un effet inhibiteur sur le développement musculaire, pourrait bien confirmer cette séduisante théorie. (Lee, 2004)

4. Exploitation du gène myostatine

L'identification de la myostatine et des conséquences de son invalidation sur le développement musculaire ouvrent évidemment de nombreuses perspectives tant dans le domaine des productions animales qu'en médecine humaine. Chez le bovin, l'identification d'une série allélique de mutations de la myostatine responsable du caractère culard permet sans la moindre ambiguïté la sélection en faveur ou en défaveur du caractère pour les races concernées. Elle rend également envisageable l'idée d'inhiber la myostatine afin d'augmenter la masse musculaire, non seulement chez le bovin mais également dans d'autres espèces (porc, mouton, poulet, poissons) chez qui la conservation de la séquence de la protéine augure probablement d'une conservation de sa fonction. Cette inactivation pourrait être médiée par l'emploi d'inhibiteurs spécifiques (anticorps ou protéines régulatrices) ou par la création d'animaux transgéniques.

Chez l'homme, des inhibiteurs de la myostatine pourraient être utilisés en vue d'améliorer les symptômes de maladies musculaires dégénératives (myopathie de Duchenne) ou de maladies chroniques accompagnées d'importantes fontes musculaires (cancer, sida). Le rôle de la myostatine chez l'homme, pressenti en

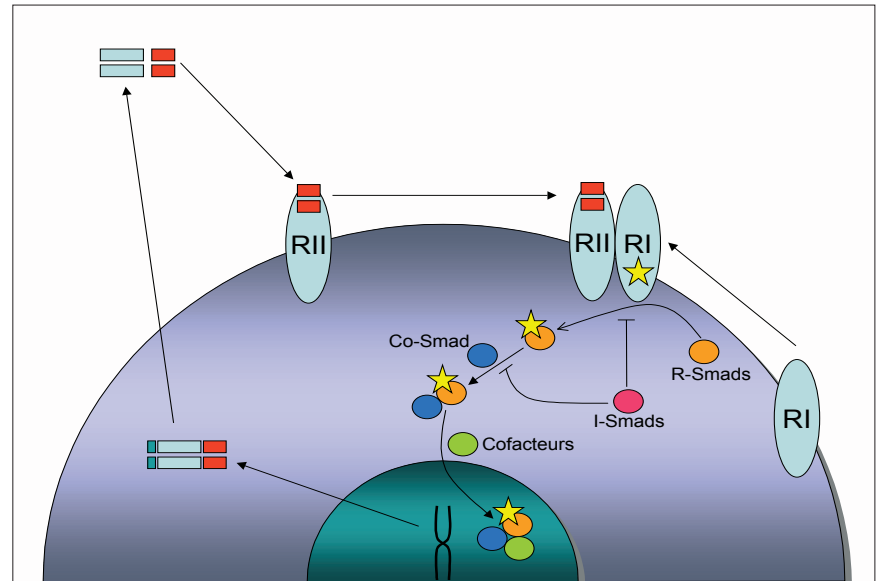
raison de la conservation de la séquence protéique, a été récemment confirmé suite à la description d'un variant perte de fonction chez un jeune enfant à la musculature extrême (Schuelke *et al.*, 2004).

Nous avons décidé dans notre laboratoire d'utiliser la voie de la transgénèse (voir ANNEXE 4 : Eléments de transgénèse) afin de créer chez le bovin un caractère culard inductible, dominant et spécifique du sexe mâle. D'une part, l'induction du caractère culard après la naissance permettrait d'éviter le recours systématique à la césarienne chez le bovin BBB. D'autre part, un caractère culard lié au sexe mâle, via l'intégration d'un inhibiteur de la myostatine sur le chromosome Y de fibroblastes foetaux issus d'un mâle laitier, puis la création d'un bovin transgénique grâce au clonage par transfert de noyau, permettrait d'imaginer un schéma d'élevage bovin idéal dans lequel, au sein d'une seule et même race, les mâles seraient viandeux et les femelles laitières. Afin de démontrer la pertinence de la méthode, nous avons manipulé la myostatine par voie transgénique chez la souris. Nous avons créé (i) un modèle murin d'inactivation postnatale et muscle-spécifique de la myostatine et (ii) un modèle d'inactivation mâle-spécifique de la myostatine.

4.1. Inactivation postnatale et muscle-spécifique de la myostatine

Afin de mesurer les effets d'une inactivation postnatale de la myostatine, Grobet et collaborateurs (2003) ont généré un modèle murin d'inactivation de la myostatine conditionnée à l'expression de la recombinase Cre (« knock-out conditionnel » : voir ANNEXE 4). Cela a requis (i) l'insertion de sites loxP de part et d'autre du troisième exon du gène myostatine (codant pour le domaine carboxyterminal bioactif de la protéine) par recombinaison homologue en cellules embryonnaires souches (ES), (ii) l'aggrégation de ces cellules ES avec des morulas afin d'obtenir la souris transgénique correspondante (souris floxée) et (iii) le croisement de cette souris floxée avec une souris transgénique dont l'expression de la recombinase Cre, dirigée par le promoteur MCK (*Muscle Creatine Kinase*), est postnatale et muscle-spécifique (Brüning *et al.*, 1998). Nous avons observé chez la souris née de ce croisement que la délétion postnatale et muscle-spécifique du troisième exon de la myostatine induisait une augmentation de la masse musculaire dont l'ampleur est comparable à celle observée lors de l'inactivation cons-

Figure 2 : Les TGF β lient des récepteurs sérine thréonine kinase, induisant une cascade de phosphorylations intracellulaires via les protéines Smads.



Les TGF β sont synthétisés sous forme d'une préproprotéine processée puis sécrétée. Après activation de la proprotéine dans le milieu extracellulaire, le ligand (homodimère carboxyterminal) se lie à un récepteur sérine thréonine kinase de type II. Le complexe ligand récepteur recrute et phosphoryle un récepteur de type I qui à son tour phosphoryle une R-Smad (Smad 1, 2, 3, 5 et 8). Une R-Smad phosphorylée s'associe à une Co-Smad (Smad 4) puis le complexe Smad ainsi formé lie d'autres facteurs de transcription ainsi que des coactivateurs et corépresseurs, entre dans le noyau et régule l'expression des gènes cibles. Les I-Smads (Smad 6 et 7) exercent leur effet inhibiteur en empêchant l'association des R-Smads aux récepteurs de type I ainsi qu'à Smad 4.

titutive (« knock-out »), cet effet étant dû principalement à une augmentation de la taille des fibres musculaires (hypertrophie).

4.2. Inactivation mâle-spécifique de la myostatine

En utilisant une stratégie de ciblage en deux étapes, nous avons introduit un transinhibiteur de la myostatine sur le chromosome Y murin (Pirottin *et al.*, 2005). Dans un premier temps, deux vecteurs d'insertion (Rohozinski *et al.*, 2002) contenant deux cassettes de sélection (positive et négative, voir ANNEXE 4) flanquées par deux sites loxP hétérologues, loxP et lox2272 (Lee et Saito, 1998 ; Kolb, 2001) ont été introduits sur le chromosome Y par recombinaison homologue. Un des deux vecteurs a été inséré au niveau du locus TSPY (*testis specific protein Y encoded*), un pseudogène exprimé chez la souris (Mazeyrat et Mitchell, 1998). L'autre construction génique a été insérée environ 13 kilobases en amont de ce locus. Dans un deuxième temps, les séquences comprises entre les sites loxP hétérologues ont été remplacées par un transinhibiteur de la myostatine pareillement floxé au cours d'un processus d'échange médié par la recombinase Cre (RMCE : *Recombinase Mediated Cassette Exchange*). Le transinhibiteur est le propeptide de la myostatine, placé sous la dépendance

des éléments régulateurs (promoteur et *enhancer*) du locus MLC1F (*Myosin Light Chain 1 F*) qui limitent son expression au muscle squelettique (Rosenthal *et al.*, 1989). Plusieurs études ont démontré que le propeptide empêchait la liaison de la myostatine à son récepteur et limitait donc son activité biologique (Thies *et al.*, 2001 ; Lee et McPherron, 2001 ; Yang *et al.*, 2001 ; Wolfman *et al.*, 2003 ; Bogdanovich *et al.*, 2005). Deux lignées de souris transgéniques ont été obtenues en injectant dans des blastocystes les clones de cellules ES obtenus à l'issue du processus d'échange : une ayant intégré le transinhibiteur au locus TSPY (TSPY-LAP), l'autre 13 kilobases en amont de ce locus (UP-LAP). Au sein de ces deux lignées, le transgène ne ségrège que chez les mâles et n'est exprimé que dans les muscles. Comparés à des mâles non transgéniques de même fond génétique, les mâles TSPY-LAP et UP-LAP montrent une augmentation de la masse musculaire variant de cinq à 20% selon la lignée et le muscle considéré, cet effet étant dû, au moins en partie, à une hypertrophie des fibres musculaires.

En conclusion, ces résultats démontrent qu'il est possible chez la souris d'induire une augmentation de la masse musculaire en inactivant la myostatine après la naissance ou uniquement chez le mâle et ouvrent donc la voie à des travaux similaires chez le bovin.

5. Remerciements

Que soient chaleureusement remerciés tous ceux qui ont contribué au projet « culard » dans le laboratoire de génétique : Dominique Poncelet, Benoît Brouwers, Luis Royo, Cristina Fernandez, Anne Cornet et Antoine Adamantidis. Je tiens tout particulièrement à remercier Carole Charlier et Juliette Riquet pour leur soutien et leur sens critique.

POSITIONAL CLONING AND GENETIC ENGINEERING OF THE MYOSTATIN GENE CAUSING DOUBLE MUSCLING IN CATTLE.

Double-muscling in cattle is a generalised hypertrophy of skeletal muscle resulting from a hyperplasia of the myofibers. Using a positional cloning strategy, we have identified the gene underlying double-muscling, namely myostatin, and causal loss-of-function mutations therein. Myostatin is a novel member of the TGF- β superfamily of growth and differentiation factors. Using conditional gene targeting in a murine model, we have demonstrated that post-natal muscle spe-

cific inactivation of the myostatin gene causes full-blown double muscling. This demonstrates the potential value of myostatin antagonist whether to promote muscle regeneration in patients suffering from muscle wasting disease, or to enhance meat production in livestock species. Finally, by targeting a myostatin transinhibitor on the Y chromosome, we have demonstrated in the mouse the feasibility of a more efficient cattle production system combining superior beef production abilities for bulls and dairy abilities for cows.

RÉFÉRENCES

- AMTHOR H., NICHOLAS G., MCKINNELL I., KEMP C.F., SHARMA M., KAMBADUR R., PATEL K. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev. Biol.*, 2004, **270**(1):19-30.
- ANSAY M., HANSET R. Anatomical, physiological and biochemical differences between conventional and double-muscling cattle in the Belgian Blue and White breed. *Livestock Production Science*, 1979, **6**, 5-13.
- ARNOLD H.H., WINTER B. Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1998, **8**(5), 539-544.
- ATTISANO L., WRANA J.L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 2002, **296**(5573), 1646-1647.
- BOGDANOVICH S., KRAG T.O., BARTON E.R., MORRIS L.D., WHITTEMORE L.A., AHIMA R.S., KHURANA T.S. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, 2002, **420**(6914), 418-421.
- BOGDANOVICH S., PERKINS K.J., KRAG T.O., WHITTEMORE L.A., KHURANA T.S. Myostatin pro-peptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB. J.*, 2005, **19**(6), 543-549.
- BRUNING J.C., MICHAEL M.D., WINNAY J.N., HAYASHI T., HORSCH D., ACCILI D., GOODYEAR L.J., KAHN C.R. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol. Cell.*, 1998, **2**(5), 559-569.
- BUCKINGHAM M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2001, **11**(4), 440-448.
- BULLOUGH W.S. The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 1962, **37**, 307-42.
- BULLOUGH W.S. Mitotic and functional homeostasis: a speculative review. *Cancer Res.*, 1965, **25**(10), 1683-727.
- CAMPBELL K.H., MCWHIR J., RITCHIE W.A., WILMUT I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, **380**(6569), 64-66.
- CARMELL M.A., ZHANG L., CONKLIN D.S., HANNON G.J., ROSENQUIST T.A. Germline transmission of RNAi in mice. *Nat. Struct. Biol.*, 2003, **10**(2), 91-92.
- CHARLIER C., COPPIETERS W., FARNIR F., GROBET L., LEROY P.L., MICHAUX C., MNI M., SCHWERS A., VANMANSHOVEN P., HANSET R., GEORGES M. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm. Genome*, 1995, **6**(11), 788-792.
- CLARK J., WHITELAW B. A future for transgenic livestock. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**(10), 825-33.
- COSSU G., TAJBAKSH S., BUCKINGHAM M. How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends Genet.*, 1996, **12**(6), 218-223.
- CULLEY G. Observations in Livestock. G. Woodfall: London, 1807.
- CURRIE P.D., INGHAM P.W. The generation and interpretation of positional information within the vertebrate myotome. *Mech. Dev.*, 1998, **73**(1), 3-21.
- DERYNCK R., ZHANG Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003, **425**(6958), 577-584.
- DYKXHOORN D.M., NOVINA C.D., SHARP P.A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2003, **4**(6), 457-467.
- EVANS M.J., KAUFMAN M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 1981, **292**(5819), 154-156.
- FIRE A., XU S., MONTGOMERY M.K., KOSTAS S.A., DRIVER S.E., MELLO C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, **391**(6669), 806-811.

- GOLOVAN S.P., MEIDINGER R.G., AJAKAIYE A., COTTRILL M., WIEDERKEHR M.Z., BARNEY D.J., PLANTE C., POLLARD J.W., FAN M.Z., HAYES M.A., LAURSEN J., HJORTH J.P., HACKER R.R., PHILLIPS J.P., FORSBERG C.W. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**(8), 741-745. Erratum in: *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**(10), 979.
- GORDON J.W., SCANGOS G.A., PLOTKIN D.J., BARBOSA J.A., RUDDLE F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, **77**(12), 7380-7384.
- GROBET L., MARTIN L.J., PONCELET D., PIROTTIN D., BROUWERS B., RIQUET J., SCHOEBERLEIN A., DUNNER S., MENISSIER F., MASSABANDA J., FRIES R., HANSET R., GEORGES M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.*, 1997, **17**(1):71-74.
- GROBET L., PONCELET D., ROYO L.J., BROUWERS B., PIROTTIN D., MICHAUX C., MENISSIER F., ZANOTTI M., DUNNER S., GEORGES M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome*, 1998, **9**(3), 210-213.
- GROBET L., PIROTTIN D., FARNIR F., PONCELET D., ROYO L.J., BROUWERS B., CHRISTIANS E., DESMECHT D., COIGNOUL F., KAHN R., GEORGES M. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*, 2003, **35**(4), 227-238.
- GROS J., MANCEAU M., THOME V., MARCELLE C. A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature*, 2005, **435**(7044), 954-958.
- GUSTIN P. Spécificités fonctionnelles du système respiratoire des bovins hypervivandous (Ph.D.Thesis). Université de Liège, 1989.
- HAMMER R.E., PURSEL V.G., REXROAD C.E. JR, WALL R.J., BOLT D.J., EBERT K.M., PALMITER R.D., BRINSTER .RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, **315**(6021), 680-683.
- HANSET R., MICHAUX C. Creatine and creatinine levels in plasma, red cells and muscles as characteristics of double-muscling cattle. In: King W.B., Menissier F.(Eds), Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Martinus Nijhoff Publishers: The Hague, 1982, 237-257.
- HANSET R., MICHAUX C., DESSY-DOISE C., BURTONBOY G. Studies on the 7th rib cut in double-muscling and conventional cattle. Anatomical, histological and biochemical aspects. In: King W.B., Menissier F.(Eds), Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Martinus Nijhoff Publishers: The Hague, 1982, 341-349.
- HANSET R., MICHAUX C. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. I Experimental data. *Génét. Sél. Evol.*, 1985a, **17**(3), 359-368.
- HANSET R., MICHAUX C. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed. II Population data. *Génét. Sél. Evol.*, 1985b, **17**(3), 369-386.
- HILL J.J., DAVIES M.V., PEARSON A.A., WANG J.H., HEWICK R.M., WOLFMAN N.M., QIU Y. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**(43), 40735-40741.
- HILL J.J., QIU Y., HEWICK R.M., WOLFMANN M. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol. Endocrinol.*, 2003, **17**(6), 1144-1154.
- ITO Y., MIYAZONO K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2003, **13**(1), 43-47.
- JI S., LOSINSKI R.L., CORNELIUS S.G., FRANK G.R., WILLIS G.M., GERRARD D.E., DEPREUX F.F., SPURLOCK M.E. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol.*, 1998, **275**(4 Pt 2), R1265-1273.
- JOULIA D., BERNARDI H., GARANDEL V., RABENOELINA F., VERNUS B., CABELLO G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell. Res.*, 2003, **286**(2), 263-275.
- KAMBADUR R., SHARMA M., SMITH T.P., BASS J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 1997, **7**(9), 910-916.
- KOLB A.F. Selection-marker-free modification of the murine beta-casein gene using a lox2272 [correction of lox2722] site. *Anal. Biochem.*, 2001, **290**(2), 260-271. Erratum in: *Anal. Biochem.*, 2001, **295**(1), 127.
- KUROIWA Y., KASINATHAN P., MATSUSHITA H., SATHIYASELAN J., SULLIVAN E.J., KAKITANI M., TOMIZUKA K., ISHIDA I., ROBL J.M. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin-mu and prion protein in cattle. *Nat. Genet.*, 2004, **36**(7), 775-780.
- LANGLEY B., THOMAS M., BISHOP A., SHARMA M., GILMOUR S., KAMBADUR R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**(51), 49831-49840.
- LEE G., SAITO I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene.*, 1998, **216**(1), 55-65.
- LEE S.-J., MCPHERRON A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**(16), 9306-9311.
- LEE S.-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2004, **20**, 61-86.
- MARCHITELLI C., SAVARESE M.C., CRISA A., NARDONE A., MARSAN P.A., VALENTINI A. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm. Genome*, 2003, **14**(6), 392-395.
- MARTIN G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1981, **78**(12), 7634-7638.
- MASSAGUE J., BLAIN S.W., LO R.S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 2000, **103**(2), 295-309.
- MASSAGUE J., CHEN Y.G. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.*, 2000, **14**(6), 627-644.

- MASSAGUE J., WOTTON D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.*, 2000, **19**(8), 1745-1754.
- MAZEYRAT S., MITCHELL M.J. Rodent Y chromosome TSPY gene is functional in rat and non-functional in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, **7**(3), 557-562.
- MCCROSKERY S., THOMAS M., MAXWELL L., SHARMA M., KAMBADUR R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell. Biol.*, 2003, **162**(6), 1135-47.
- MCFARLANE C., LANGLEY B., THOMAS M., HENNEBRY A., PLUMMER E., NICHOLAS G., MCMAHON C., SHARMA M., KAMBADUR R. Proteolytic processing of myostatin is auto-regulated during myogenesis. *Dev. Biol.*, 2005, **283**(1), 58-69.
- MCPHERRON, A.C.; LEE, S.-J. The transforming growth factor superfamily. In : Leroith D., Bondy C. (Eds), Growth Factors and Cytokines in Health and Disease, Volume 1B. JAI press Inc.: Greenwich, 1996, 357-393.
- MCPHERRON A.C., LAWLER A.M., LEE S.-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 1997, **387**(6628) , 83-90.
- MCPHERRON A.C., LEE S.-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**(23), 12457-12461.
- MÉNISSIER, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. In: King W.B., Menissier F.(Eds), Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Martinus Nijhoff Publishers: The Hague, 1982, 23-53.
- MICHAUX C., VAN SICHEM-REYNAERT R., BECKERS J.F., DE FONSECA M., HANSET R. Endocrinological studies on double-muscled cattle : LH, GH, testosterone and insulin plasma levels during the first year of life. In: King W.B., Menissier F.(Eds), Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Martinus Nijhoff Publishers: The Hague, 1982, 350-367.
- MIYAZAWA K., SHINOZAKI M., HARA T., FURUYA T., MIYAZONO K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*, 2002, **7**(12), 1191-1204.
- MOLKENTIN J.D., OLSON E.N. Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1996, **6**(4), 445-453.
- NAGY, A., GERTSENSTEIN, M., VINTERSTEN, K., BEHRINGER, R. Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press : Cold Spring Harbor, 2003, 764 p.
- NOBREGA M.A., ZHU Y., PLAJZER-FRICK I., AFZAL V., RUBIN E.M. Megabase deletions of gene deserts result in viable mice. *Nature*, 2004, **431**(7011), 988-993.
- PARKER M.H., SEALE P., RUDNICKI M.A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.*, 2003, **4**(7), 497-507.
- PHELPS C.J., KOIKE C., VAUGHT T.D., BOONE J., WELLS K.D., CHEN S.H., BALL S., SPECHT S.M., POLEJAEVA I.A., MONAHAN J.A., JOBST P.M., SHARMA S.B., LAMBORN A.E., GARST A.S., MOORE M., DEMETRIS A.J., RUDERT W.A., BOTTINO R., BERTERA S., TRUCCO M., STARZL T.E., DAI Y., AYARES D.L. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*, 2003, **299**(5605), 411-414.
- PIROTTIN D., PONCELET D., GROBET L., ROYO L.J., BROUWERS B., MASABANDA J., TAKEDA H., FRIES R., SUGIMOTO Y., WOMACK J.E., DUNNER S., GEORGES M. High-resolution, human-bovine comparative mapping based on a closed YAC contig spanning the bovine mh locus. *Mamm. Genome*, 1999, **10**(3), 289-293.
- PIROTTIN D., GROBET L., ADAMANTIDIS A., FARNIR F., HERENS C., SCHRODER H.D., GEORGES M. Transgenic engineering of male-specific muscular hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**(18), 6413-6418.
- REBBAPRAGADA A., BENCHABANE H., WRANA J.L., CELESTE A.J., ATTISANO L. Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 2003, **23**(20), 7230-7242.
- RELAIX F., ROCAN COURT D., MANSOURI A., BUCKINGHAM M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, 2005, **435**(7044), 948-953.
- RIOS R., CARNEIRO I., ARCE V.M., DEVESA J. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **280**(2), 561-566.
- RIOS R., CARNEIRO I., ARCE V.M., DEVESA J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2002, **282**(5), C993-999.
- ROHOZINSKI J., AGOULNIK A.I., BOETTGER-TONG H.L., BISHOP C.E. Successful targeting of mouse Y chromosome genes using a site-directed insertion vector. *Genesis.*, 2002 **32**(1):1-7.
- ROSENTHAL N., KORNHAUSER J.M., DONOGHUE M., ROSEN K.M., MERLIE J.P. Myosin light chain enhancer activates muscle-specific, developmentally regulated gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, **86**(20), 7780-7784.
- SABOURIN L.A., RUDNICKI M.A. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 2000, **57**(1), 16-25.
- SCHLUNEGGER M.P., GRUTTER M.G. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 Å resolution of human transforming growth factor-beta 2. *Nature*, 1992, **358**(6385), 430-434.
- SCHUELKE M., WAGNER K.R., STOLZ L.E., HUBNER C., RIEBEL T., KOMEN W., BRAUN T., TOBIN J.F., LEE S.J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.*, 2004, **350**(26), 2682-2688.
- SHARMA M., KAMBADUR R., MATTHEWS K.G., SOMERS W.G., DEVLIN G.P., CONAGLEN J.V., FOWKE P.J., BASS J.J. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell. Physiol.*, 1999, **180**(1), 1-9.

- SHI Y., MASSAGUE J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, **113**(6), 685-700.
- TAYLOR W.E., BHASIN S., ARTAZA J., BYHOWER F., AZAM M., WILLARD D.H. JR, KULL F.C. JR, GONZALEZ-CADAVID N. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001, **280**(2), E221-228.
- TEN DIJKE P., MIYAZONO K., HELDIN C.H. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling. *Trends Biochem. Sci.*, 2000, **25**(2), 64-70.
- TEN DIJKE P., HILL C.S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.*, 2004, **29**(5), 265-273.
- THIES R.S., CHEN T., DAVIES M.V., TOMKINSON K.N., PEARSON A.A., SHAKEY Q.A., WOLFMAN N.M. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*, 2001, **18**(4), 251-9.
- THOMAS K.R., CAPECCHI M.R. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, 1987, **51**(3), 503-512.
- THOMAS M., LANGLEY B., BERRY C., SHARMA M., KIRK S., BASS J., KAMBADUR R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(51), 40235-40243.
- TORRES, R.M., KÜHN, R. Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press Inc.: New York, 1997, 167 p.
- WEGNER J., ALBRECHT E., FIEDLER I., TEUSCHER F., PAPSTEIN H.J., ENDER K. Growth and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *J. Anim. Sci.*, 2000, **78**, 1485-1496.
- WHITTEMORE L.A., SONG K., LI X., AGHAJANIAN J., DAVIES M., GIRGENRATH S., HILL J.J., JALENAK M., KELLEY P., KNIGHT A., MAYLOR R., O'HARA D., PEARSON A., QUAZI A., RYERSON S., TAN X.Y., TOMKINSON K.N., VELDMAN G.M., WIDOM A., WRIGHT J.F., WUDYKA S., ZHAO L., WOLFMAN N.M. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **300**(4), 965-71.
- WILMUT I., SCHNIEKE A.E., MCWHIR J., KIND A.J., CAMPBELL K.H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, **385**(6619), 810-813. Erratum in: *Nature*, 1997, **386**(6621), 200.
- WOLFMAN N.M., MCPHERRON A.C., PAPPANO W.N., DAVIES M.V., SONG K., TOMKINSON K.N., WRIGHT J.F., ZHAO L., SEBALD S.M., GREENSPAN D.S., LEE S.-J. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, **100**(26), 15842-15846.
- WRIGHT G., CARVER A., COTTOM D., REEVES D., SCOTT A., SIMONS P., WILMUT I., GARNER I., COLMAN A. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (NY)*, 1991, **9**(9), 830-834.
- YANG J., RATOVIJSKI T., BRADY J.P., SOLOMON M.B., WELLS K.D., WALL R.J. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol. Reprod. Dev.*, 2001, **60**(3), 351-361.
- ZIMMERS T.A., DAVIES M.V., KONIARIS L.G., HAYNES P., ESQUELA A.F., TOMKINSON K.N., MCPHERRON A.C., WOLFMAN N.M., LEE S.-J. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, 2002, **296**(5572), 1486-1488.

ANNEXE 1 : Éléments de myogenèse chez les vertébrés (Cossu et al., 1996 ; Molkentin et Olson, 1996 ; Arnold et Winter, 1998 ; Currie et Ingham, 1998 ; Sabourin et Rudnicki, 2000 ; Buckingham, 2001 ; Parker et al., 2003)

La myogenèse est la succession d'événements menant à la formation et à la croissance des muscles striés squelettiques lors du développement embryonnaire. On peut schématiquement diviser la myogenèse embryonnaire chez les vertébrés en quatre phases : (i) la formation des somites, (ii) la détermination des cellules progénitrices en myoblastes (cellules précurseurs des muscles striés squelettiques), (iii) une phase de prolifération et éventuellement de migration cellulaire et (iv) une phase de différenciation impliquant la fusion des myoblastes en myotubes

puis la maturation de ces myotubes en myofibrilles. En outre, la myogenèse se poursuit chez l'adulte, chez qui elle est notamment induite par l'exercice physique ou l'apparition d'une lésion musculaire.

1. Somitogenèse

Les somites, source des cellules progénitrices de presque tous les muscles striés squelettiques des organismes vertébrés, naissent de la segmentation du mésoderme paraxial commençant à l'extrémité antérieure de l'embryon et progressant vers l'arrière de celui-ci. Présentes tout d'abord sous la forme de sphères épithéliales délimitant une cavité de cellules mésenchymateuses, les somites vont ensuite se compartimentaliser. La partie ventrale adopte une structure purement mésenchymateuse pour devenir le sclérotome, précurseur

des vertèbres et des côtes alors que la partie dorsale conserve une structure épithéliale pour devenir le dermomyotome. Des cellules de la région dorsomédiale (épaxiale) du dermomyotome vont migrer sous ce dernier et donner naissance à la partie épaxiale du myotome, précurseur des muscles vertébraux et du dos. Les cellules de la partie ventrolatérale (hypaxiale) du dermomyotome vont migrer soit sous le dermomyotome pour former le myotome hypaxial, précurseur des muscles latéraux du tronc, soit vers la région ventrale de l'embryon pour donner les futurs muscles ventraux, soit vers les bourgeons des membres pour y donner les muscles des membres. Le dermomyotome dorsal donnera naissance au derme du tronc et de la queue. Enfin, un dernier compartiment somitique naît de l'interaction du sclérotome et du dermomyotome et est le siège des cellules progénitrices des tendons.

2. Détermination des myoblastes

L'action combinée de facteurs activateurs [Sonic hedgehog (Shh) sécrété par la notochorde et le tube neural ventral, WNTs sécrétés par le tube neural dorsal et l'ectoderme dorsal] et inhibiteurs (BMP4 sécrété par le tube neural dorsal et le mésoderme latéral) va entraîner dans le dermomyotome une cascade d'événements menant à la détermination des myoblastes, c'est-à-dire à l'entrée de certaines cellules dans la voie myogénique. Les acteurs clés de la détermination myogénique sont Myf5 et MyoD, des facteurs de transcription de type *basic helix loop helix* (bHLH) faisant partie des *Muscle Regulatory Factors* (MRFs). On sait que Myf5 est exprimé dans le myotome épaxial suite aux liaisons de Shh sur son récepteur *Patched* (Ptc) et de WNT1 (venant du tube neural dorsal) sur son récepteur *Frizzled* (Fzd). Myf5, à son tour, induit alors l'expression de MyoD. La détermination des myoblastes hypaxiaux est contrôlée par des WNTs provenant de l'ectoderme dorsal qui induisent l'expression de Pax3 (facteur de transcription *homeobox*), lui-même induisant l'expression de MyoD. Les facteurs inhibant la détermination myogénique sont (i) des formes sécrétées du récepteur Fzd (sFRP, *soluble Frizzled related Proteins*) qui capturent les WNTs dans le milieu extracellulaire et (ii) BMP4 produit par le mésoderme latéral, qui, en inhibant l'action transcriptionnelle de MyoD, permet aux cellules du dermomyotome hypaxial de proliférer et de migrer vers les sites (bourgeons des membres et paroi ventrale du tronc) où elles se différencieront. L'action inhibitrice de BMP4 au niveau hypaxial mais aussi épaxial (BMP4 est également produit par le tube neural dorsal) est à son tour contrôlée par des inhibiteurs des TGF β tels que noggin, follistatin et flik.

3. Prolifération et migration des myoblastes

Prolifération et différenciation sont des processus incompatibles. Ainsi, la prolifération des myoblastes ou leur sortie du cycle cellulaire dépendent d'un subtil équilibre entre l'action de Myf5 et MyoD d'une part et celle des complexes cyclin/cdk (*cyclin dependant kinase*) d'autre part. La présence de facteurs de croissance dans le milieu extracellulaire induit le complexe cyclinD1/cdk4 qui, en les phosphorylant, inactive à la fois p130, Myf5 et MyoD avec comme

conséquences une activation de la prolifération et une inhibition de la différenciation. Une inversion du rapport entre les cyclin/cdk et les MRFs induit l'expression de la myogénine (un troisième MRF) puis de p21 (un inhibiteur des cdk) aboutissant à la sortie du cycle cellulaire, prélude à la différenciation musculaire.

Comme mentionné précédemment, la différenciation au niveau du dermomyotome hypaxial est retardée suite à l'inhibition de MyoD par BMP4, permettant ainsi la prolifération et la migration des cellules vers des sites distants où la myogenèse peut se poursuivre. Cette phase de migration est influencée par une série de facteurs *homeobox* tels que Pax3 (qui précède et induit l'expression de MyoD), c-met et son ligand HGF/SF, Lbx1, Mox2, Gab1 et Six1 et 4. En accord avec leur rôle présumé, des mutations dans ces gènes induisent des anomalies notamment au niveau de la musculature des membres.

4. Différenciation musculaire

La différenciation des myoblastes implique la sortie du cycle cellulaire (discutée plus haut), l'expression des protéines structurelles et contractiles et la fusion des myoblastes en myotubes. Les régions régulatrices des gènes codant pour les protéines musculaires contiennent des séquences E box et MEF2. Les séquences E box sont reconnues par des hétérodimères formés par un des quatre MRFs (MyoD, Myf5, myogénine et MRF4) et une E protein (E12 ou E47). Les séquences MEF2 sont reconnues par un facteur de transcription de type MEF2 (a, b, c ou d chez les vertébrés). Ces deux types de facteur de transcription agissent en synergie pour induire l'expression des protéines musculaires. Différents facteurs régulent négativement l'activité des MRFs à ce niveau. Des facteurs de type HLH (Id, Twist, Mist1 et Imf) séquestrent les E proteins ou les MRFs ou masquent le signal de localisation nucléaire des MRFs ; des facteurs intervenant dans le cycle cellulaire (Rb, p16, p21, cyclin/cdk, Fos, c-Jun) réduisent également l'activité des MRFs ; enfin, PKC (*Protein Kinase C*) réduit l'activité de la myogénine en phosphorylant une thréonine dans le domaine de liaison à l'ADN. On sait également que MyoD interagit avec des *Histone acétyl-transférases* (p300/CBP et pCAF) ainsi qu'avec d'autres facteurs de transcription (TFIID, TFIIB) afin

d'activer le programme myogénique. L'expression des marqueurs musculaires est bientôt suivie de la fusion des myoblastes en structures multinucléées appelées myotubes, suivie par la maturation de ces myotubes et la spécification des fibres musculaires (lentes ou rapides) contrôlée par l'innervation.

5. Myogenèse postnatale

Entre la lame basale et la membrane sarcoplasmique se trouvent des cellules souches particulières appelées cellules satellites. Suite à un exercice physique ou à une lésion musculaire, ces cellules jusqu'alors quiescentes sont activées en MPC (*Myogenic Precursor Cell*), prolifèrent (expression de MyoD et Myf5), se différencient (expression de la myogénine et de MRF4) puis fusionnent entre elles ou avec des myofibres existantes. La myogenèse postnatale semble donc analogue à bien des égards à la myogenèse embryonnaire, bien que les facteurs activant les cellules satellites soient peu connus. Par contre, on sait que Pax7 (paralogue de Pax3) est essentiel à la genèse des cellules satellites, tandis que MyoD est nécessaire à leur activation. Il a été également montré récemment que des cellules souches de la moelle osseuse étaient capables de coloniser les muscles et intervenaient dans la croissance ou la régénération musculaires postnatales.

Une nouvelle population de cellules progénitrices musculaires a été récemment décrite chez la souris (Relaix *et al.*, 2005) et le poulet (Gros *et al.*, 2005). Au moment de la transition épithélio-mésenchymateuse du dermomyotome, point de départ de la formation du derme, ces cellules migrent de la partie centrale du dermomyotome vers le myotome sous-jacent. Expriment à la fois Pax3 et Pax7, mais pas les marqueurs de différenciation musculaire, elles prolifèrent au sein du myotome et constituent une réserve de cellules permettant la croissance musculaire embryonnaire et fœtale. D'autre part, elles sont vraisemblablement à l'origine des cellules satellites chez l'adulte.

ANNEXE 2 : Principes du clonage positionnel d'un caractère monogénique

Le clonage positionnel est devenu la méthode de choix en vue de l'identification et de la caractérisation du gène et des mutations associées à un phénotype d'intérêt. Il a supplanté peu à peu

d'autres méthodes utilisées auparavant dans le même but, telles le clonage fonctionnel ou l'approche dite « des gènes candidats ». Nous envisageons les étapes successives du clonage positionnel, à savoir (i) la localisation subchromosomique du locus par études de liaison génétique, (ii) la cartographie génétique fine et la cartographie physique via la construction d'un contig de clones chevauchants et (iii) la recherche de gènes au sein de ce contig et l'identification d'un candidat positionnel pour le caractère étudié. Nous aborderons dans la quatrième partie les progrès nés des programmes de séquençage de génomes entiers.

1. Localisation subchromosomique par études de liaison génétique

1.1. Principe

La deuxième loi de Mendel nous enseigne que les allèles de loci non liés (non synténiques ou synténiques mais distants) ségrégent de façon indépendante : une moitié des gamètes d'un individu contient les combinaisons d'allèles parentales tandis que l'autre moitié contient les combinaisons recombinantes. Par contre, si les loci sont liés, la proportion de gamètes recombinants chute en raison du fait que leur production dépend de l'établissement d'un crossing-over entre les loci. Plus les loci sont proches, plus la probabilité de l'existence d'un crossing-over entre eux diminue, entraînant une diminution de la proportion de gamètes recombinants. Le pourcentage de recombinaison entre deux loci (θ), converti en centiMorgans (cM) via l'utilisation d'une fonction de cartographie, est utilisé afin de déterminer la distance génétique entre ces loci puis de les ordonner sur une carte génétique.

1.2. Pedigrees informatifs

Un pedigree est informatif s'il est possible d'y suivre la ségrégation des allèles à la fois du locus cible et des marqueurs génétiques qui serviront à le cartographier. Autrement dit, un des parents (individus générant les méioses informatives) au moins doit être hétérozygote pour le gène causal et les marqueurs génétiques utilisés. Le locus cible étant inconnu, la ségrégation de ses allèles est révélée par l'expression phénotypique du caractère. La classification phénotypique

est donc cruciale lors de l'établissement de pedigrees. Relativement aisée dans le cas de caractères qualitatifs (par exemple la couleur de la robe chez le bovin), cette étape nécessite un œil averti et des observations répétées dans le cas de caractères quantitatifs (par exemple le caractère culard). Les pedigrees peuvent être constitués de novo en vue de l'étude à réaliser (pedigrees expérimentaux) ou extraits de la population existante (pedigrees de terrain). Les premiers sont aisément générés chez les animaux de laboratoire en raison de leur grande fertilité et de leur faible intervalle de génération. À l'opposé, la cartographie génétique de maladies héréditaires chez l'homme ne se fait que à l'aide de pedigrees « de terrain ». La situation du bovin est intermédiaire.

1.3. Marqueurs génétiques

Les études de liaison génétique ont pour but de localiser le gène d'intérêt au sein d'une carte de marqueurs génétiques. Ces cartes sont obtenues en compilant les données de génotypage produites à partir de pedigrees de référence (IBRP : *International Bovine Reference Family Panel*) utilisés par la communauté scientifique. La nature des marqueurs génétiques a varié au cours du temps : RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) et minisatellites (ou VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*) ont laissé la place aux microsatellites (ou SSLP, *Single Sequence Length Polymorphism*) qui, à leur tour, sont progressivement supplantés par les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). La qualité d'un marqueur, quantifiée par le PIC (*Polymorphism Information Content*), dépend du nombre de ses allèles (polymorphisme) ainsi que de la fréquence respective de ces allèles dans la population. Les microsatellites, très polymorphes, sont pourtant remplacés par les SNP, bi-alléliques et donc moins polymorphes, mais plus densément représentés dans le génome. D'autre part, l'évolution des marqueurs est allée de pair avec celle des techniques de génotypage : la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a permis le typage des microsatellites à grande échelle et l'utilisation des micropuces d'ADN permet maintenant de caractériser 10000 SNPs chez un individu en une seule manipulation.

1.4. Analyse des données de génotypage

Elle se fait en deux étapes. Tout d'abord, l'analyse deux points permet de déterminer la liaison du locus d'intérêt à un marqueur ou un groupe de marqueurs de la carte génétique. L'hypothèse d'une liaison du locus cible avec chacun des marqueurs génétiques est statistiquement testée par le *lodscore* (Z). Le *lodscore* est le \log_{10} d'un rapport de vraisemblances (L) : au dénominateur, la vraisemblance des observations sous l'hypothèse d'une absence de liaison entre les deux loci testés ($\theta = 50\%$) et au numérateur, la vraisemblance des observations sous l'hypothèse d'une liaison pour un θ donné, inférieur à 50%. En fonction de la valeur du *lodscore*, on conclura à l'existence d'une liaison ($Z > 3$) ou à l'absence de liaison ($Z < -2$). Une valeur intermédiaire réclame davantage de données pour conclure. Ensuite, l'analyse multipoint permet d'ordonner les marqueurs entre eux puis un *lodscore* est calculé pour chaque position du locus cible au sein de la carte de marqueurs ordonnés. La position la plus vraisemblable du locus est celle qui maximise la valeur du *lodscore*.

2. Cartographie génétique fine et cartographie physique

Une réduction de la taille de l'intervalle génétique passe par l'identification de nouveaux marqueurs et de nouvelles méioses informatives ou par l'exploitation des méioses ancestrales à travers l'utilisation du déséquilibre de liaison (DL). La recherche de nouveaux marqueurs nécessite la construction d'un ensemble de clones génomiques chevauchants (*contig*) à grands inserts (YAC, *Yeast Artificial Chromosome* ou BAC, *Bacterial Artificial Chromosome*). Ces clones, couvrant l'intervalle génétique préalablement défini, sont ordonnés puis l'identification de nouveaux microsatellites se fait par criblage de ces clones à l'aide d'une sonde $(CA)_n$. Préalablement à leur utilisation, la localisation des nouveaux marqueurs devra être confirmée en utilisant des méthodes de cartographie physique : hybrides somatiques et hybrides irradiés.

Une méthode alternative pour la cartographie génétique fine est l'utilisation du déséquilibre de liaison exploitant

les recombinants « historiques ». Si on suppose que la mutation causale est apparue chez un ancêtre commun, cette mutation a été transmise aux descendants « atteints » au sein d'un segment chromosomique ancestral qui s'est réduit au cours des méioses successives en raison de la recombinaison méiotique. On peut donc supposer que tous les individus « atteints » de la génération présente partagent non seulement la mutation causale mais aussi un segment chromosomique « identique par descendance » et caractérisé par une combinaison d'allèles communs pour un certain nombre de marqueurs flanquant le gène causal, appelée haplotype. L'intervalle défini par cet haplotype commun entre les individus atteints, au sein duquel se situe le gène causal, sera d'autant plus réduit que la mutation causale est apparue depuis longtemps.

3. Recherche de gènes dans l'intervalle défini et identification d'un candidat positionnel

L'étape suivante consiste à rechercher des séquences transcrites au sein du contig physique. Les méthodes utilisées sont basées soit sur l'hybridation des clones génomiques avec des banques d'ADN complémentaires, soit sur la présence de sites d'épissage (capture d'exons). Alternativement, les clones génomiques peuvent être séquencés puis les séquences soumises à des logiciels de prédiction de gènes. Parmi les gènes ainsi définis, des candidats positionnels sont identifiés en raison d'un mode d'expression et d'une fonction compatibles avec le phénotype d'intérêt. L'identification du gène causal parmi les candidats positionnels se fait en comparant l'expression ainsi que la séquence codante des gènes entre des individus extrêmes pour le phénotype étudié. La causalité d'une mutation devra enfin être confirmée par étude d'association (parfaite corrélation entre la mutation et la présence du caractère) et/ou à l'aide d'études fonctionnelles *in vitro* ou *in vivo* (par exemple par transgénèse : voir ANNEXE 4).

4. Apports des projets de séquençage de génomes entiers

La disponibilité des séquences génomiques complètes chez l'homme et la souris et plus récemment d'un premier assemblage de la séquence du génome

bovin ainsi que la densification de la carte de marqueurs et la constitution de contigs de BACs couvrant la totalité du génome bovin ont considérablement accéléré le processus de clonage positionnel chez les animaux de rente. Ainsi, il est possible actuellement d'identifier très rapidement de nouveaux marqueurs en vue d'une cartographie génétique fine sans passer par l'étape fastidieuse de la construction d'un contig physique. Les méthodes d'identification de gènes au sein du contig sont également devenues obsolètes puisque la cartographie comparée nous renseigne sur le contenu en gènes des régions humaine et murine orthologues, gènes dont notre connaissance de la fonction va croissant en raison des projets d'inactivation de gènes à grande échelle chez la souris. Enfin, comme mentionné plus haut, l'étape initiale de localisation par études de liaison génétique se fait de plus en plus rapidement grâce à l'utilisation des SNPs dont la composition allélique binaire a favorisé le développement de méthodes de génotypage de plus en plus efficaces.

ANNEXE 3 : La superfamille des TGFβ (McPherron et Lee, 1996 ; Massagué *et al.*, 2000 ; Massagué et Chen, 2000 ; Massagué et Wotton, 2000 ; ten Dijke *et al.*, 2000 ; Attisano et Wrana, 2002 ; Miyazawa *et al.*, 2002 ; Derynck et Zhang, 2003 ; Ito et Miyazono, 2003 ; Shi et Massagué, 2003 ; ten Dijke et Hill, 2004)

La superfamille de facteurs de croissance et de différenciation de type TGFβ compte une trentaine de membres chez l'homme [TGFβ1, 2 et 3, activines et inhibines, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *müllerian inhibiting substance/anti-müllerian hormone* (MIH/AMH), nodal, *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) et une série de *growth and differentiation factors* (GDFs)] ainsi que de nombreux orthologues chez d'autres mammifères, le xénope, la drosophile et le nématode *Caenorhabditis elegans*.

Globalement, ces facteurs sont impliqués dans la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaires, tant au cours du développement embryonnaire que chez l'adulte. Bien que leurs fonctions et leurs séquences protidiques diffèrent largement, tous

les membres sont structurellement apparentés à TGFβ1, prototype de la famille découvert en 1985. Ils sont synthétisés sous forme de préproprotéines contenant un peptide signal, un domaine central glycosylé — appelé LAP (*latency associated peptide*) chez TGFβ — séparé du domaine carboxyterminal par un site de clivage protéolytique dibasique (RXXR) (Figure 1). Au cours de la sécrétion, la préproprotéine subit deux clivages protéolytiques : le premier élimine le peptide signal et le deuxième sépare les domaines amino- et carboxyterminaux. Le peptide carboxyterminal contient une série de cystéines conservées (six, sept ou neuf) (Figure 1) dont le rôle a été mis en évidence par l'étude de la structure tridimensionnelle de TGFβ2 (Schlunegger et Grütter, 1992). Ces cystéines sont impliquées dans quatre ponts disulfures intramoléculaires dont trois confèrent à la molécule une structure tridimensionnelle particulière appelée « nœud de cystéines » ainsi qu'un pont disulfure intermoléculaire qui, dans la plupart des cas, renforce les interactions hydrophobiques par lesquelles les peptides carboxyterminaux dimérisent pour former le ligand mature et biologiquement actif.

Les membres de la famille des TGFβ lient des récepteurs membranaires à activité sérine-thréonine kinase classés en récepteurs de types I et II. On dénombre chez les mammifères sept récepteurs de type I [activin receptor like kinase (ALK) 1, ALK2, ALK3 (=BMPR-IA), ALK4 (=ActR-IB), ALK5 (=TβR-I), ALK6 (=BMPR-IB) et ALK7] et cinq récepteurs de type II (TβR-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II et AMHR-II). La liaison d'un ligand à un récepteur II recrute et active un récepteur I en phosphorylant plusieurs sérines et thréonines au niveau d'une région riche en glycines et sérines appelée région GS, induisant au même coup un changement conformationnel qui active le domaine kinase adjacent. La transmission du signal du complexe récepteur-ligand jusqu'au noyau se fait par l'intermédiaire des Smads [contraction de « mad » (*Drosophila mother against dpp*) et « Sma » (orthologue de *C. elegans*)], protéines d'environ 500 acides aminés possédant deux domaines globulaires (*mad* homology domains, MH1 et MH2) séparés par un *linker* riche en prolines. Les R-Smad (*receptor regulated Smad*) s'associent aux récep-

teurs I (RI) via leur domaine MH2 : Smads 2 et 3 (AR-Smads) s'associent aux récepteurs activés par TGF β , activines et nodal tandis que Smads 1, 5 et 8 (BR-Smads) lient les récepteurs activés par les BMPs, GDFs et MIS. L'activation des R-Smads suite à leur phosphorylation par RI au niveau de deux sérines d'une séquence SXS à l'extrémité carboxyterminale de la protéine permet leur association à une co-Smad (*common partner Smad* : uniquement Smad4 chez les mammifères) via les domaines MH2. Ce complexe di- ou trimérique (2 R-Smads et Smad4) migre vers le noyau, s'associe à des facteurs de transcription (via MH1 et MH2) ainsi qu'à des coactivateurs et corépresseurs (via MH2) et régule l'activité transcriptionnelle des gènes cibles (Figure 2). La liaison du complexe transcriptionnel aux séquences régulatrices des gènes cibles se fait à la fois via les domaines MH1 qui se lient à des SBE (*Smad binding element*) et via les facteurs de transcription associés qui lient leur séquence cible propre. Le trafic nucléocytoplasmique des Smads est régulé à la fois activement (par des β *importins* liant un signal de localisation nucléaire dans MH1) et passivement via l'association de MH2 à des composants des pores nucléaires (nucléoporines).

Le paradoxe entre d'une part la multiplicité des effets biologiques ainsi que leur spécificité vis à vis du type et du contexte cellulaire et d'autre part une simple dualité dans le mode de transmission intracellulaire du signal (AR et BR-Smads) s'explique par un système de régulation complexe intervenant à tous les niveaux. Ainsi, des protéines extracellulaires (LAP-TGF β , *noggin*, *chordin*, *folliculin*) et transmembranaires (*betaglycan*, *endoglin*) régulent la liaison du ligand à son récepteur ; FKBP12 lie la région GS de RI et empêche son activation par RII ; BAMBI (BMP and *activin membrane bound inhibitor*) est un compétiteur de RI pour la liaison à RII ; SARA (*Smad anchor for receptor activation*), une protéine intracellulaire liée à la membrane via un domaine FYVE, ancre les R-Smads aux RI et favorise l'internalisation de ce complexe dans des endosomes recouverts de clathrine ; les I-Smads (*inhibitory Smads* : Smads 6 et 7) sont des compétiteurs des R-Smads pour leur association aux RI et à Smad4. Les complexes Smads s'associent à de nombreux facteurs de transcription (FAST-1, AP-

1, TFE3, ATF2, AML, RUNX) leur conférant une double spécificité : type cellulaire et gène cible. En outre, bien qu'ils possèdent une activité transcriptionnelle intrinsèque (via MH2), les complexes Smads recrutent des coactivateurs (CBP et p300 possédant des activités histone acétyl transférase) et des corépresseurs [c-Ski, SnoN, TGIF qui recrutent directement ou indirectement via NcoR (*nuclear corepressor*) des HDACs (histone déacétylases)] qui régulent l'activité transcriptionnelle des gènes cibles. L'activité des complexes transcriptionnels est supprimée soit par la déphosphorylation des Smads, soit par le recrutement par les R-smads de protéines à activité *ubiquitin ligase* [smurf 1 et 2 (*Smad ubiquitination regulatory factor*), APC (*anaphase promoting complex*), arka-dia] qui induisent la dégradation dans des protéasomes non seulement des complexes transcriptionnels nucléaires mais aussi des R-smads cytoplasmiques ainsi que des complexes RI-Smad7.

Les effets des TGF β sont également modulés par d'autres cytokines. Ainsi, EGF (*epidermal growth factor*), interféron γ et TNF α (*tumor necrosis factor*) induisent l'expression des I-smads, Erk MAPK (*mitogen activated protein kinase*) induite par HGF (*hepatocyte growth factor*) et EGF mais aussi CamKII (*calcium/calmodulin dependant protein kinase II*) phosphorylent le *linker* des R-smads avec pour conséquence une inhibition de la migration nucléaire. Enfin, des travaux récents suggèrent que les TGF β pourraient également transmettre leur signal indépendamment des Smads, par exemple en activant des GTPases de la famille Rho.

Les divers effets cellulaires médiés par les TGF β leur confèrent un rôle central tant au cours du développement embryonnaire que chez l'adulte. Il n'est donc pas étonnant de constater que de nombreuses mutations, germinales ou somatiques, impliquant les ligands, les récepteurs, les smads ou un des nombreux cofacteurs évoqués ci-dessus, sont à l'origine de nombreux cancers (pancréatiques, gastro-intestinaux, ovariens) ainsi que de troubles du développement parmi lesquels la synostose héréditaire (inactivation de *noggin*), la télangiectasie hémorragique héréditaire (ALK1 et *endoglin*), l'hypertension pulmonaire primaire familiale (BMPR-II), la persistance des canaux de Müller (AMH/MIS et AMHR-II) ou la holoprosencéphalie (TGIF).

ANNEXE 4 : Eléments de transgénèse (Torres et Kuhn, 1997 ; Nagy et al., 2003)

La possibilité de modifier de manière héritable le génome d'organismes modèles tels que la souris, bien que porteur d'un potentiel inestimable, notamment pour l'étude de la fonction des gènes ou pour la modélisation de maladies humaines, est longtemps restée à l'état d'utopie. Ce concept est devenu réalité au début des années '80 avec l'avènement de la transgénèse par addition puis, bien plus encore, avec la recombinaison homologue en cellules embryonnaires souches (ES) quelques années plus tard. Les lignes qui suivent décrivent brièvement les techniques classiques utilisées en transgénèse chez la souris et abordent l'utilisation de la transgénèse chez les animaux de rente.

1. Transgénèse par addition

La première souris transgénique fut obtenue en 1980 en microinjectant une construction génique dans les pronuclei de zygotes, c-à-d d'embryons fraîchement fécondés (Gordon et al., 1980). L'insertion de l'ADN étranger dans le génome hôte se fait généralement avant le premier clivage de l'embryon avec pour conséquence la naissance d'individus susceptibles de transmettre le transgène à la moitié de leurs descendants. Bien que l'efficacité de la méthode soit très variable, on peut s'attendre en moyenne à la naissance de cinq souris transgéniques pour 100 embryons injectés. Les inconvénients majeurs de la technique sont l'impossibilité de contrôler le site d'intégration ainsi que le nombre de copies intégrées avec pour conséquences un niveau d'expression aléatoire et le risque d'induire des mutations délétères si le transgène inactive un gène essentiel au développement. Parmi les nombreuses applications de l'injection pronucléaire, citons l'étude de la régulation de l'expression génique ou l'observation des conséquences phénotypiques de l'expression d'un transgène.

2. Recombinaison homologue en cellules embryonnaires souches

Deux découvertes ont révolutionné la génétique de la souris et la transgénèse en particulier dans le courant des années '80. La première décrit l'isolation et la culture de cellules embryon-

naires souches (ES) dérivées de blastocystes murins (Martin, 1981 ; Evans et Kaufman, 1981). Ces cellules sont multipotentes : leur injection dans un blastocyste donne naissance à une souris chimérique dont tous les tissus sont potentiellement colonisés par les cellules ES et qui, en cas de colonisation de la lignée germinale, transmet le génome des cellules ES à sa descendance. Quelques années plus tard, Thomas et Capecchi (1987) démontrent qu'il est possible de modifier le génome des cellules ES de manière ciblée grâce à la recombinaison homologue entre des séquences d'ADN identiques présentes à la fois dans le transgène et dans le locus ciblé. La rareté de l'événement de recombinaison homologue par rapport à l'intégration aléatoire du transgène nécessite l'utilisation de stratégies de sélection positive (intégration d'une cassette de résistance, par exemple *neomycin phosphotransferase*) et/ou négative (disparition d'une cassette de sélection, par exemple *thymidine kinase*) dont il a été démontré qu'elles n'interfèrent pas avec les aptitudes de colonisation germinale des cellules ES.

La recombinaison homologue en cellules ES couplée à la microinjection de blastocystes a permis de générer des centaines de lignées de souris « *knock-out* » caractérisées par le remplacement d'un gène par une cassette de sélection en cellules ES et qui constituent évidemment des outils précieux pour l'étude de la fonction des gènes. La recombinaison homologue en cellules ES permet également de générer des souris « *knock-in* » caractérisées par le remplacement d'un gène par un autre, par exemple un gène rapporteur (étude de l'expression chez l'hétérozygote, destin des cellules chez l'homozygote) ou un gène apparenté (discernement des fonctions). Enfin, il est également possible d'induire des mutations plus discrètes (par exemple des mutations ponctuelles) via un processus en deux étapes, introduisant puis éliminant respectivement des marqueurs de sélection positive puis négative (« *hit and run* » ou « *double replacement* »).

3. Le système de recombinaison Cre/lox

Chez le bactériophage P1, la recombinaison Cre (*Causes recombination*) reconnaît et induit la recombinaison entre des sites de 34 paires de bases (pb) appelés loxP [*Locus of crossover (x) in P1*] cons-

titués de deux séquences répétées inversées de treize pb interrompues par une séquence centrale de huit pb qui donne à l'ensemble son orientation. L'enzyme Cre est une recombinase site-spécifique de la famille des λ intégrases qui, comme quelques autres membres de la famille, ne requiert aucun cofacteur ni protéines accessoires pour assurer sa fonction.

La démonstration de la fonctionnalité du système Cre/lox en cellules de mammifères ainsi que *in vivo* chez la souris en a fait un outil précieux en ingénierie génétique. En effet, en fonction de la disposition et de l'orientation de sites loxP insérés dans un génome par recombinaison homologue, l'expression de la recombinase Cre est capable d'induire des délétions, insertions, inversions, translocations ainsi que des échanges de segments d'ADN via l'utilisation de sites lox mutants (RMCE : *recombinase mediated cassette exchange*).

L'application la plus importante du système Cre/lox chez la souris, le « knock-out conditionnel », requiert tout d'abord d'insérer par recombinaison homologue des sites loxP de part et d'autre du gène à inactiver (souris « floxée ») puis de croiser cette souris avec une autre souris transgénique exprimant Cre sous la dépendance d'un promoteur tissu-spécifique et/ou stade-spécifique. Chez les souris issues de ce croisement, l'inactivation du gène est spatio-temporellement corrélée à l'expression de la Cre recombinase et n'a donc lieu que dans le(s) tissu(s) et à partir du moment où la recombinase est exprimée. Cette technique permet notamment d'étudier la fonction de gènes dont l'inactivation constitutive entraîne la mort durant la gestation. D'autres applications importantes du système Cre/lox chez la souris sont l'excision d'un marqueur de sélection floxé (alternative à la méthode « *hit and run* » pour l'insertion de mutations dites « propres ») ainsi que l'excision de larges segments génomiques (Nobrega *et al.*, 2004).

4. Transgénèse chez les animaux de rente

Les premiers animaux transgéniques autres que la souris furent également obtenus par l'injection d'ADN dans des zygotes (Hammer *et al.*, 1985). Aux problèmes évoqués chez la souris (imprévisibilité du site d'insertion et du nombre de copies du transgène) s'ajoute une très faible efficacité : trois à cinq % des individus nés sont transgéniques.

En 1996, Campbell et collaborateurs

décrivent le premier mammifère né par transfert nucléaire à partir d'une lignée cellulaire embryonnaire puis Wilmot et collaborateurs font de même en 1997 à partir d'une lignée cellulaire adulte. Ces travaux ont ouvert la voie à la mutagenèse dirigée chez les animaux de rente, qui est maintenant possible via la recombinaison homologue en cellules puis le clonage par transfert de noyau. L'efficacité de ces techniques reste cependant très faible et leur coût élevé.

Une amélioration pourrait venir de l'utilisation de techniques récemment décrites telles l'utilisation de vecteurs dérivés des lentivirus (lentivecteurs) et la RNA interférence. Ainsi, l'infection d'embryons fraîchement fécondés par des lentivecteurs est beaucoup plus simple et efficace que l'injection d'ADN en vue de la création d'un animal transgénique par addition. D'autre part, il a été découvert récemment que la dégradation d'ARN messagers spécifiques par des petits ARN double brin homologues, initialement observée chez *Caenorhabditis elegans* et connue sous le nom de RNA interference (Fire *et al.*, 1998), fonctionne également en cellules de mammifères (Dykxhoorn *et al.*, 2003) et même chez des souris transgéniques exprimant de tels ARN interférents sous la forme de « *small hairpin RNA* » (shRNA) (Carmell *et al.*, 2003). L'intégration de tels shRNA via l'infection de zygotes par des lentivecteurs pourrait constituer une alternative intéressante à la recombinaison homologue et au transfert de noyau en vue de l'inactivation d'un gène chez les animaux de rente (Clark et Whitelaw, 2003).

Parmi les applications de la transgénèse chez les animaux de rente, citons la production de protéines recombinantes à usage médical dans le lait de brebis (Wright *et al.*, 1991), la délétion chez le porc d'un antigène responsable des rejets hyperaigus lors de xéno-transplantation chez l'homme (Phelps *et al.*, 2003), la naissance de porcs exprimant une phytase salivaire et excréant donc moins de phosphate (Golovan *et al.*, 2001) ou la délétion chez le bovin de deux gènes différents suite à quatre événements successifs de recombinaison homologue en fibroblastes fœtaux (Kuroiwa *et al.*, 2004).