

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation :** Santé et Productions animales
- Titre de la thèse en français :** Etude des effecteurs responsables du phénotype callipyge et des trans-inhibiteurs qui contribuent à la surdominance polaire.
- Titre de la thèse en anglais :** Elucidation of the effectors responsible for the callipyge phenotype and the trans-inhibitors contributing to polar overdominance
- Candidat :** Erica Davis
- Promoteur :** Prof. Michel Georges
- Co-promoteur :** Dr. Carole Charlier
- Département et Service :** Unité de Génomique animale, Département de Production animale
- Date de la défense publique :** le 16 septembre 2005
- Composition du Jury :** *Membres extérieurs à la faculté :*
Edith Heard (Institut Curie, Paris), Miikka Vikkula (UCL, Bruxelles)
Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :
Luc Grobet, Daniel Desmecht, Fabrice Bureau, Frédéric Rollin, Etienne Thiry

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Le phénotype callipyge est une hypertrophie musculaire généralisée décrite chez le mouton. Sa caractéristique principale est son mode de transmission non-mendélien qualifié de surdominance polaire : seul les hétérozygotes ayant reçu la mutation *CLPG* de leur père expriment le phénotype. La mutation *CLPG* est une mutation ponctuelle invalidant un élément qui régule - en cis - le taux d'expression musculaire de gènes voisins soumis à l'empreinte : deux gènes codant exprimés à partir de l'allèle paternel (*DLK1* & *PEG11*), et plusieurs gènes non-codants exprimés à partir de l'allèle maternel. Au début de cette thèse nous postulions que le phénotype callipyge exprimés par les individus $+^{Mat}/CLPG^{Pat}$ était dû à l'expression d'un

effecteur exprimé à partir de l'allèle *CLPG^{Pat}* et que l'absence d'expression chez les individus *CLPG/CLPG* était dû à une trans-inhibition de l'effecteur par des ARN non-codants exprimés à partir de l'allèle *CLPG^{Mat}*. C'est ce que nous nous sommes attelés à vérifier.

RÉSULTATS

Dans un premier temps, nous avons démontré qu'en étudiant l'expression du gène *DLK1* au niveau protéique (par immunohistochimie) plutôt qu'ARN, celui-ci n'était détectable que chez les animaux $+^{Mat}/CLPG^{Pat}$, et chez ceux-ci uniquement à un stade du développement et dans les muscles exprimant le phénotype callipyge. Nous avons donc démontré une corrélation parfaite entre la présence de la protéine *DLK1* et l'expression phé-

notypique.

Nous avons ensuite démontré que cette expression ectopique de *DLK1* dans le muscle squelettique était bel et bien responsable du phénotype callipyge (au moins partiellement). Ceci a été réalisé en produisant deux lignées de souris transgéniques exprimant la protéine *DLK1* ovine sous la dépendance du promoteur et enhancer *MLC* de rat. Ces souris exprimaient la protéine *DLK1* dans leurs muscles et présentaient, par rapport aux contrôles non transgéniques, une hypertrophie musculaire détectable à la fois macroscopiquement et microscopiquement. L'absence de protéines *DLK1* chez les individus *CLPG/CLPG* étaient virtuellement la preuve d'une la trans-inhibition médiée par le chromosome *CLPG^{Mat}*. Mais quelle en est la nature ? Il se fait que le domaine

« imprimé » *DLK1-GTL2* est caractérisé par une concentration remarquable en microRNA et que ceux-ci sont exprimés à partir de l'allèle maternel. Ils apparaissent donc comme des candidats trans-inhibiteurs uniques. Deux de ces microRNA (*mir127* et *mir136*) ont la particularité d'être complémentaire au gène *PEG11* qui était donc vraisemblablement leur cible. Malgré le fait que le rôle de *PEG11* dans le déterminisme du phénotype callipyge n'est pas encore connu, nous avons voulu tester cette hypothèse. Nous avons obtenu les résultats suivants : (i) nous avons identifié x nouveaux microRNA complémentaires à *PEG11* par analyse bioinformatique, (ii) nous avons démontré leur expression y compris dans le muscle squelettique chez la souris et le mouton,

(ii) nous avons démontré que ceux-ci étaient bien processés par Drosha en isolant les produits de clivage correspondants par RLM 5'RACE, et (iv) nous avons démontré qu'ils clivaient bien *PEG11* en isolant les produits de clivage correspondants par RLM 5'RACE. Ces résultats ont des implications importantes tant pour la compréhension de la surdominance polaire que pour celle de la théorie du conflit visant à expliquer l'avantage sélectif de l'empreinte parentale.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans cette thèse, nous avons donc (i) identifié un élément effecteur (DLK1) responsable - en partie au moins - de l'hypertrophie musculaire caractérisant le phénotype callipyge, et (ii) identifié un mécanisme de trans-inhibition de produits de l'allèle paternel (*PEG11*) par des produits de l'allèle maternel (des microRNA). Pour boucler la boucle, il conviendra (i) de tester le rôle ou non de *PEG11* dans le déterminisme de l'hypertrophie musculaire callipyge (des souris transgéniques sont en cours de production et de caractérisation afin de répondre à cette question), et (ii) d'identifier les mécanismes (de type RNAi ou non) impliqués dans la trans-inhibition de *DLK1*.

REFERENCES

Publications issues du travail de thèse

DAVIS, E., HARKEN JENSEN, C., SCHRODER, H.D., FARNIR, F., SHAY, T., KLIEM, A., COCKETT, N., GEORGES, M. & CHARLIER, C. Ectopic expression of DLK1 protein in skeletal muscle of padumnal heterozygotes causes the callipyge phenotype. *Current Biology*, 2004, **14**, 1858-62.

DAVIS, E., CAIMENT, F., TORDOIR, X., COCKETT, N., GEORGES, M. & CHARLIER, C. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted *Rtl1/Peg11* locus. *Current Biology*, 2005, **15**, 743-49.

REMERCIEMENTS

This project was supported by grants from (i) the FRFC (n° 2.4525.96), (ii) Crédit aux Chercheurs (n° 1.5.134.00) from the FNRS, (iii) Crédit à la Recherche from the ULg, (iv) the SSTC (n° 0135), (v) the European Union (Callimir), (vi) the Utah Center of Excellence Program, (vii) the USDA/NRICGP Grants #94-04358, #96-35205 and #98-03455), (viii) the Utah Agricultural Experiment Station, USU, and (ix) the ACI (Biologie cellulaire, moléculaire et structurale). Erica Davis is a fellow of the Belgian American Educational Foundation.