

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation :** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Clonage positionnel du gène mh chez le bovin Blanc Bleu Belge et ingénierie génétique de la myostatine
- Titre de la thèse en anglais :** Positional cloning of the mh gene in the Belgian White and Blue cattle breed and transgenic engineering of myostatin
- Candidat :** Dimitri Pirottin
- Promoteur :** Professeur M. Georges
- Département et Service :** Département des Productions animales, Unité de Génomique animale
- Date de la défense publique :** le 30 septembre 2005
- Composition du Jury :**
- Membres extérieurs à la faculté :*
Professeur J. Martial, ULg, Belgique, Professeur J.-P. Renard, INRA, France,
Docteur C. Ledent, IRIBHM, Belgique
- Membres internes à la faculté de Médecine vétérinaire :*
Professeur M. Georges, Professeur D. Desmecht, Professeur P. Lekeux,
Professeur P. Leroy, Professeur Chr. Hanzen, Professeur E. Thiry,
Docteur N. Antoine, Docteur A. Vanderplasschen

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Le caractère culard chez le bovin est une augmentation généralisée de la masse des muscles squelettiques (25 % en moyenne) résultant d'une hyperplasie des fibres musculaires (Hanset *et al.*, 1986). Le déterminisme héréditaire du caractère, pressenti mais controversé pendant de nombreuses années, a été confirmé par des expériences de ségrégation plaçant en faveur de l'intervention d'un gène majeur autosomal et d'un allèle « culard » partiellement récessif (Hanset *et al.*, 1985). L'existence du locus correspondant, baptisé « mh », a été confirmée par sa localisation par étude de liaison génétique sur l'extrémité subcentromérique du chromosome 2 bovin (Charlier *et al.*, 1995).

Le travail effectué au cours de cette thèse s'inscrit au sein d'un projet dont les buts sont (i) de poursuivre le processus de clonage positionnel afin d'identifier le gène mh et (ii) de manipuler ce gène par voie transgénique chez la souris afin de transformer le caractère culard, autosomal récessif, en un caractère inductible, dominant et mâle-spécifique.

1. Clonage positionnel du gène mh chez le bovin Blanc Bleu Belge (BBB)

Durant cette première partie du projet, il s'agissait de (i) affiner la localisation génétique du gène mh en développant de nouveaux marqueurs dans la région, (ii) construire un contig de YACs (*Yeast Artificial Chromosomes*) de la région définie génétiquement et (iii) construire une carte comparée bovin-

humain afin d'identifier d'éventuels candidats positionnels dans la région orthologue humaine.

Ces travaux ont abouti à l'identification du gène responsable, la myostatine, ainsi qu'à la description d'une série allélique de mutations perte de fonction responsables du caractère « culard » chez le bovin.

2. Ingénierie génétique de la myostatine

La démonstration d'une éventuelle augmentation de la masse musculaire consécutive à une inactivation de la myostatine après la naissance ouvrirait de nombreuses perspectives tant dans le domaine de l'élevage que de la médecine humaine en rendant pertinente l'utilisation d'antagonistes de la myostatine chez l'adulte afin d'améliorer le rendement à l'abattage

des animaux de rente ou la fonte musculaire associée à certaines maladies chroniques chez l'homme. Nous avons donc étudié les effets de l'inactivation postnatale de la myostatine chez la souris en développant un modèle Knock-Out conditionnel.

D'autre part, les schémas de sélection en vigueur chez les bovins ont abouti à l'obtention de deux cheptels hyper-spécialisés distincts. L'un se concentre sur la production de lait et exploite des races telles les Holstein-Frisonne ou Jersey ; l'autre se consacre à la production de viande et est basé sur des races tel la Blanc-Bleu Belge, la Charolaise, l'Angus, etc...Ce mode d'élevage, bien qu'économiquement rentable, peut être considéré comme suboptimal. En effet, en raison d'antagonismes physiologiques entre les productions de lait et de muscle, les mâles laitiers ne produisent pas de lait et sont de médiocres producteurs de viande alors que les femelles viandeuses produisent à la fois peu de lait et de viande. Nous proposons donc un système de production plus performant basé sur une spécialisation selon les sexes au sein de la même race : les vaches seraient laitières, les taureaux viandeux. Afin de démontrer la faisabilité de ce concept, nous avons placé un transinhibiteur de la myostatine sur le chromosome Y murin et étudié les effets sur la masse musculaire des souris transgéniques.

RÉSULTATS

1. Clonage positionnel du gène mh chez le bovin Blanc Bleu Belge

Après que des études de liaison génétique aient localisé le gène mh sur l'extrémité subcentromérique du chromosome 2 bovin, à 2 centimorgans du marqueur microsatellite le plus proche (Charlier *et al.*, 1995), la construction d'un contig de

YACs (*Yeast Artificial Chromosome*) a été entreprise en vue d'une cartographie physique fine du locus (Pirotin *et al.*, 1999). La description subséquente d'un nouveau membre de la famille des TGF- appelé GDF-8 puis myostatine en raison de l'augmentation spectaculaire et généralisée de la masse musculaire résultant de l'inactivation de ce gène chez la souris (McPherron *et al.*, 1997) nous a mis sur la piste de ce candidat positionnel. Nous avons tout d'abord démontré, à l'aide de la cartographie par hybrides d'irradiation, que ce candidat se trouvait dans la région humaine orthologue à la région bovine définie précédemment. Nous avons ensuite montré que le caractère culard chez le Blanc Bleu Belge était dû à une délétion de onze paires de bases dans la séquence codante de la myostatine, avec pour effet un décalage de la phase de lecture et l'apparition d'un codon STOP prématuré qui supprime la partie biologiquement active de la protéine (Grobet *et al.*, 1997). Une série allélique de mutations perte de fonction de la myostatine a été mise en évidence, induisant le caractère culard dans plusieurs races bovines européennes (Charolais, Maine-Anjou, Gasconne, Parthenaise, Piedmontese, Asturiana, Rubia Gallega) (Grobet *et al.*, 1998 ; Kambadur *et al.*, 1997 ; McPherron et Lee, 1997).

L'identification du gène responsable nous permettait d'une part de développer des méthodes de sélection assistée par marqueur afin de maintenir ou d'éliminer le caractère. Elle nous permettait d'autre part de manipuler la myostatine et de moduler son action dans des expériences d'ingénierie génétique. Nous avons donc choisi la voie de la transgénèse murine afin de démontrer qu'il était possible de transformer le caractère culard, autosomal et récessif, en un caractère inductible, dominant et mâle spécifique.

2. Ingénierie génétique de la myostatine

Nous avons démontré chez la souris que (i) l'inactivation postnatale et muscle-spécifique de la myostatine induit une augmentation de la masse musculaire identique à celle observée lors de son inactivation constitutive et (ii) il était possible de lier le caractère culard au sexe mâle.

2.1 *Inactivation postnatale de la myostatine*

En combinant la technique de ciblage de gène en cellules ES et la technologie Cre-lox (Torres et Kühn, 1997), nous avons généré une souris « Knock-Out conditionnel » (KOC) de la myostatine. Cette souris est doublement transgénique. Elle contient d'une part deux séquences de 34 paires de base (bp), appelées sites loxP, de part et d'autre du troisième exon du gène de la myostatine et d'autre part un transgène codant pour une protéine appelée Cre (*causes recombination*) capable de reconnaître ces sites LoxP et d'induire la suppression du fragment compris entre ces sites LoxP. Cette recombinase Cre est exprimée sous la dépendance du promoteur Muscle Creatine Kinase (MCK) qui lui confère une expression postnatale et musculaire (Bruning *et al.*, 1998). Par conséquent, cette souris KOC est caractérisée par une inactivation de la myostatine n'intervenant que dans les cellules musculaires et après la naissance. Nous avons démontré que cette inactivation, bien que spatiotemporellement limitée, reproduit totalement l'augmentation de la masse musculaire décrite chez le Knock-Out constitutif (Grobet *et al.*, 2003).

2.2 *Inactivation de la myostatine liée au sexe mâle*

Afin de transformer le caractère culard, autosomal, en un caractère

lié au sexe mâle, nous avons placé un transinhibiteur de la myostatine sur le chromosome Y murin.

On sait que la myostatine est synthétisée sous la forme d'une préproprotéine constituée d'un peptide signal, d'un propeptide aminoterminal et d'un domaine carboxyterminal responsable de l'activité biologique de la protéine. après séparation du propeptide par clivage protéolytique. Il a été démontré que l'expression du propeptide dans les muscles de souris transgéniques était capable d'inhiber la myostatine et d'induire une augmentation généralisée de la masse musculaire (Lee et McPherron, 2001). Nous avons donc décidé de placer sur le chromosome Y un transgène constitué du propeptide de la myostatine placé sous la dépendance des éléments régulateurs de l'expression du gène MLC1F (Myosin Light Chain 1 Fast), conférant une expression précoce, forte et muscle-spécifique (Rosenthal *et al.*, 1989).

Afin de surmonter le caractère très peu recombino-gène du chromosome Y, nous avons ciblé un pseudogène transcriptionnellement actif, appelé TSPY (Testis Specific Protein Y encoded) (Mazeyrat et Mitchell, 1998). Le ciblage a eu lieu en 2 étapes : recombinaison homologue à l'aide d'un vecteur d'insertion puis remplacement de ce vecteur d'insertion par le transgène MLC1F-propeptide à l'aide d'une technique appelée RMCE (*Recombinase Mediated Cassette Exchange*) (Kolb, 2001 ; Lee et Saito, 1998).

Nous avons ainsi généré 2 lignées de souris transgéniques caractérisées par l'insertion du transinhibiteur soit sur le pseudogène TSPY, soit 15 kb en amont de ce pseudogène. Nous avons démontré pour ces 2 lignées de souris que (i) le transgène ne ségrège que chez les mâles, (ii) il n'est exprimé

que dans les muscles des mâles et (iii) l'expression de ce transgène induit une augmentation de la masse musculaire allant de 5 à 20 % en fonction du muscle et de la lignée considérés (Pirottin *et al.*, 2005).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours des travaux précédemment décrits, nous avons donc tout d'abord identifié le gène responsable de l'hypertrophie musculaire généralisée chez le bovin de race Blanc Bleu Belge. Une série de mutations dans la phase codante de ce gène, appelé myostatine, entraînent une perte de fonction de la protéine et donc le développement du caractère culard non seulement chez le Blanc Bleu Belge mais aussi dans plusieurs autres races européennes. L'identification du gène et des mutations responsables permet de sélectionner les individus sans ambiguïté, que ce soit pour conserver ou pour éliminer le caractère, incompatible avec certains schémas d'élevage extensif.

L'identification de la myostatine nous a également permis de moduler sa fonction au cours de manipulations de transgénèse chez la souris. Dans ce cadre, nous avons démontré que l'inactivation de la myostatine après la naissance était capable de récapituler les caractéristiques phénotypiques observées lors de l'inactivation constitutive du gène chez la souris Knock-Out. L'inactivation du gène, consécutive à l'expression de la recombina-se Cre, est induite dans les 15 premiers jours suivant la naissance des souriceaux. Il serait intéressant de pouvoir étudier les effets d'une inactivation plus tardive, notamment chez l'adulte, ce qui requerrait de croiser notre souris « floxée » (comportant 2 sites loxP de part et d'autre du troisième exon de la myostatine) avec une souris

exprimant la Cre recombina-se sous la dépendance d'un promoteur inducible. Néanmoins, les effets observés dans notre modèle de souris KOC ouvrent la voie à l'utilisation d'antagonistes de la myostatine chez l'adulte tant dans le domaine agricole que médical. Il permet également d'envisager la création d'animaux de rente transgéniques n'exprimant le caractère culard qu'après la naissance.

La démonstration que la présence d'un inhibiteur de la myostatine sur le chromosome Y murin est apte à induire une hypertrophie musculaire mâle-spécifique prouve, quant à elle, qu'il est possible d'imaginer une race bovine dans laquelle les mâles seraient viandeux et les femelles laitières. Il faut cependant noter que l'effet observé est moindre que chez les souris KO et KOC. Une amélioration de cet effet est tout à fait envisageable à travers le choix d'un autre inhibiteur, d'un autre promoteur ou d'un autre site d'intégration. Bien évidemment, la perspective la plus intéressante est la transposition de la méthode au bovin. On sait que TSPY ne constitue pas une cible utilisable chez le bovin car il est fonctionnel et répété. La création d'un caractère culard mâle-spécifique chez le bovin nécessitera donc (i) la caractérisation du chromosome Y bovin, (ii) le ciblage de ce chromosome par un transinhibiteur myostatine en fibroblastes et (iii) la création d'un bovin transgénique par la technique de clonage par transfert de noyau.

REFERENCES

- 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**, 559-569.
- CHARLIER C., COPPIETERS W., FARNIR F., GROBET L., LEROY P., 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**, 788-792.
- GROBET L., ROYO MARTIN L.J., PONCELET D., PIROTTIN D., BROUWERS B., RIQUET J., SCHOEBERLEIN A., DUNNER S., MÉNISSIER F., MASSABANDA J., FRIES R., HANSET R., GEORGES M. A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle. *Nat. Genet.*, 1997, **17**, 71-74.
- GROBET L., PONCELET D., ROYO MARTIN L.J., BROUWERS B., PIROTTIN D., MICHAUX C., MÉNISSIER 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**, 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**, 227-238.
- 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**, 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**, 369-386.
- HANSET R. Double-muscling in cattle. In: Smith C., King J.W., McKay J.C. (Eds), Exploiting new technologies in animal breeding: genetic developments. Oxford University Press: Oxford, 1986, 71-80.
- KAMBADUR R., SHARMA M., SMITH T.P.L., BASS J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Res.*, 1997, **7**, 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**, 260-271. Erratum in: *Anal. Biochem.*, 2001, 295, 127.
- LEE G., SAITO I. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene.*, 1998, **216**, 55-65.
- LEE S.J., MCPHERRON A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2001, **98**, 9306-11.
- MAZEYRAT S., MITCHELL M.J. Rodent Y chromosome TSPY gene is functional in rat and non-functional in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 1998, **7**, 557-562.
- MCPHERRON A.C., LAWLER A.M., LEE S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGFβ superfamily member. *Nature*, 1997, **387**, 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**, 12457-12461.
- PIROTTIN D., PONCELET D., GROBET L., ROYO L.J., BROUWERS B., MASABANDAJ, TAKEDAH, 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**, 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**, 6413-6418.
- 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**, 7780-7784.
- TORRES, R.M., KÜHN, R. Laboratory protocols for conditional gene targeting. Oxford University Press: New York, 1997, 167 p.

Publications issues du travail de thèse

- GROBET L., ROYO MARTIN L.J., PONCELET D., PIROTTIN D., BROUWERS B., RIQUET J., SCHOEBERLEIN A., DUNNER S., MÉNISSIER F., MASSABANDA J., FRIES R., HANSET R., GEORGES M. A deletion in the myostatin gene causes double-muscling in cattle. *Nat. Genet.*, 1997, **17**, 71-74.
- GROBET L., PONCELET D., ROYO MARTIN L.J., BROUWERS B., PIROTTIN D., MICHAUX C., MÉNISSIER 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**, 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**, 227-238.
- PIROTTIN D., PONCELET D., GROBET L., ROYO L.J., BROUWERS B., MASABANDAJ, TAKEDAH, 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**, 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**, 6413-6418.

Remerciements

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été financés par les Ministères fédéral et wallon de l'Agriculture ainsi que par la firme SYNX (Toronto, Canada).