



**HAL**  
open science

# Cibles moléculaires de la myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire chez la souris et le bovin

Ilham Chelh

► **To cite this version:**

Ilham Chelh. Cibles moléculaires de la myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire chez la souris et le bovin. Génétique animale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF21962 . tel-00725232v2

**HAL Id: tel-00725232**

**<https://theses.hal.science/tel-00725232v2>**

Submitted on 24 Aug 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ÉCOLE DOCTORALE*  
*SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

*SPÉCIALITÉ :*

***GÉNOMIQUE FONCTIONNELLE ET BIOCHIMIE***

Soutenue le 19 octobre 2009

**Ilham CHELH**

---

**CIBLES MOLÉCULAIRES DE LA MYOSTATINE  
IMPLIQUÉES DANS L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE  
CHEZ LA SOURIS ET LE BOVIN**

---

**Jury**

Président :	M. PEYRET Pierre	Professeur à l'Université Blaise Pascal
Rapporteurs :	Mme BLANQUET Véronique	Professeur à l'Université de Limoges
	M. COTTIN Patrick	Professeur à l'Université Bordeaux I
Examinatrice :	Mme COMBARET Lydie	Chargée de recherche à l'INRA
Directeurs de thèse :	M. HOCQUETTE Jean-François	Directeur de recherche à l'INRA
	Mme CASSAR-MALEK Isabelle	Chargée de recherche à l'INRA

Laboratoire d'accueil:  
Unité de Recherches sur les Herbivores (URH)  
Équipe Croissance et Métabolisme du Muscle (C2M)



Centre de Recherches de Clermont-Ferrand / Theix  
63122 Saint-Genès Champanelle, France



*À Mes parents,*

*À tous ceux que j'aime,*

*Avec toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*"Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve, une réalité" (Antoine de Saint Exupéry)*



# Remerciements

*Je tiens à remercier ici les personnes, qui de près de loin, m'ont apporté un soutien professionnel mais surtout personnel durant ces trois années de thèse.*

*Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail de thèse: Monsieur Pierre Peyret, le président, Madame Véronique Blanquet et Monsieur Patrick Cottin, les rapporteurs de ce travail, Madame Lydie Combaret, examinatrice de ce travail ainsi que mon encadrante de thèse, Madame Isabelle Cassar-Malek et mon directeur de thèse, Monsieur Jean-François Hocquette.*

*Je remercie chaleureusement Madame Isabelle Cassar-Malek, Merci Isabelle de m'avoir confié ce projet et de l'avoir encadré d'une manière exceptionnelle. Merci d'avoir cru en moi et d'avoir été toujours disponible. J'ai beaucoup appris durant ces trois années à tes côtés, au travers de ta rigueur scientifique, ton organisation, ton enthousiasme et ton honnêteté. Tu as rempli ta mission avec excellence et humanité.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur Jean-François Hocquette pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Recherches sur les Herbivores. Je le remercie à la hauteur de la confiance qu'il m'a accordée et pour toujours trouvé le temps de répondre à mes questions.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Madame Brigitte Picard, pour m'avoir bien accueilli au sein de l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle. Merci Brigitte pour ta disponibilité et ta gentillesse.*



*Je tiens également à remercier Monsieur Damien Freyssenet de m'avoir reçue dans son Unité Physiologie et Physiopathologie de l'Exercice et de l'Handicap à Saint-Etienne pour la réalisation des expériences d'électrotransfert. Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.*

*Je souhaite exprimer mon remerciement aussi à Monsieur Philippe Gatellier, mon encadrant du Master 2. Merci de m'avoir initié à cette culture de la recherche et de m'avoir transmis sa passion.*

*Je souhaite remercier l'ensemble des titulaires de l'équipe, qui ont partagé ma vie quotidienne tout au long de ces trois années de thèse et avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants:*

*Merci Bruno pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour tes conseils précieux*

*Merci Christiane et Geneviève pour votre aide et vos conseils techniques en protéomique et en transcriptomique ainsi que pour votre soutien et votre gentillesse*

*Merci Nicole pour ta participation technique à ce travail*

*Merci David et Jean-Luc pour votre joie de vivre et votre bonne humeur.*

*Je remercie également Arnaud (de notre équipe) et Sébastien (de l'équipe TALL) pour leur aide et leurs conseils avisés en PCR,*

*Un grand merci à Catherine, Didier, Mari-Jo, Anne et toute l'équipe C2M pour la bonne ambiance, votre accueil et votre sympathie.*

*Un grand remerciement à tous les membres de l'équipe RIA : Maryse, Jean-Paul, Denise, Eliane, Jean-François et Nicolas pour leur gentillesse et leur aide pour toutes les questions administratives.*





*Merci à tous les stagiaires, les thésards et les personnels non-permanents de C2M qui se sont succédés dans l'équipe (Carine, Thibault, Caroline...), merci pour votre bonne humeur et votre amitié. Merci aussi Nicolas pour ta bonne humeur et tes blagues sans faille ! Même si je les comprenais pas toutes !*

*Des remerciements très chaleureux vont à mes amis de France et aussi de l'autre coté de la Méditerranée: Fadoua, Houda, Lamia, Hajer, Samira, Rime, le couple Jihen et Wadie et leur fille Lina, le couple Abdel et Dounia... merci pour votre soutien sans faille et votre amitié. Une pensée, bien sûr, à notre ami Mohammed, un jeune docteur qui nous a quitté.*

*Je souhaite remercier vivement tous les membres de l'association « AubièreEntraide », M. Ritoux, Ingrid, Caroline, Manue et tous les autres... C'était vraiment agréable et très enrichissant de travailler avec vous tout le long de ces années. C'est l'occasion pour moi de vous témoigner de ma profonde amitié.*

*Je ne saurais finir sans exprimer mes remerciements les plus sincères à ma très chère famille, malgré toute la distance qui nous séparait, leur aide et leur soutien m'étaient les plus réconfortants tout au long de ce périple.*



# Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	<b>1</b>
<b>Liste des publications</b> .....	<b>4</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>11</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>14</b>
<b>Introduction bibliographique</b> .....	<b>17</b>
<i>I. Le tissu musculaire squelettique, un tissu hétérogène et très spécialisé</i> .....	<i>18</i>
I.1. Plusieurs compartiments tissulaires .....	18
I.2. La fibre musculaire et ses propriétés .....	19
I.2.1. Propriétés contractiles .....	19
I.2.2. Propriétés métaboliques.....	21
<i>II. La myogenèse</i> .....	<i>22</i>
II.1. Une succession d'étapes bien orchestrée .....	22
II.2. Plusieurs générations de fibres à l'origine de la diversité des fibres musculaires .....	23
II.3. Régulation de la myogenèse .....	23
II.3.1. Les facteurs myogéniques .....	24
II.3.2. Induction de la myogenèse .....	25
II.3.3. Migration des myoblastes .....	26
II.3.4. Différenciation.....	26
II.3.5. Croissance musculaire et régénération .....	28
<i>III. Régulation de la masse musculaire</i> .....	<i>30</i>
III.1. Atrophie .....	30
III.2. Hypertrophie .....	32
<i>IV. La Myostatine</i> .....	<i>35</i>
IV.1. Mutation associées à des phénotypes hypermusclés.....	35
IV.2. Caractéristiques .....	36
IV.2.1. Le gène de la myostatine.....	36
IV.2.2. Structure de la protéine.....	38
IV.3. Expression .....	39
IV.4. Activité biologique .....	41
IV.4.1. Mécanismes d'action .....	41
IV.4.1.1. Récepteurs et transduction cellulaire.....	41
IV.4.1.2. Régulation de l'activité de la myostatine .....	42
IV.4.2. Effets biologiques.....	46
IV.4.2.1. Régulation de la prolifération (hyperplasie des fibres).....	46
IV.4.2.2. Régulation de la différenciation .....	47
IV.4.2.3. Activation des cellules satellites .....	48
IV.4.2.4. Rôle dans l'adipogenèse et l'ostéogenèse .....	48
IV.5. Des effets en faveur d'une utilisation raisonnée en agronomie.....	49
IV.6. Implications biomédicales.....	50



<b>Matériels &amp; méthodes</b> .....	<b>52</b>
I. <i>Animaux et Echantillons</i> .....	53
I.1. Prélèvement du muscle Quadriceps de souris (Publications 1 et 2).....	53
I.2. Prélèvement du muscle ST des bovins (Publication 3).....	53
II. <i>Transcriptomique</i> .....	53
III. <i>Protéomique</i> .....	55
III.1. Extraction des protéines pour l'analyse 2-DE.....	55
III.2. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE).....	55
III.3. Analyses d'images.....	56
III.4. Identification des protéines.....	56
IV. <i>Validation des données</i> .....	57
IV.1. Par Western-blot.....	57
IV.2. Par RT-PCR.....	58
IV.3. Par RT <sup>2</sup> PCR Array.....	58
IV.4. Validations des données chez les bovins.....	58
V. <i>Analyses bioinformatiques</i> .....	59
VI. <i>Mesure de la fragmentation de l'ADN sur coupes histologiques</i> .....	59
VII. <i>Electrotransfert du gène MSTN</i> .....	60
VII.1. Animaux.....	60
VII.2. Injection intramusculaire.....	60
VII.3. Prélèvement tissulaire et conditionnement des échantillons.....	60
VII.4. Conditionnement pour analyse histologique.....	61
<b>Résultats &amp; Discussion</b> .....	<b>62</b>
<b>Article I: Chelh et al., 2009 publié dans "BMC Genomics"</b> .....	<b>63</b>
I. <i>Article I: Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets</i> .....	64
I.1. Introduction à l'article I.....	64
I.2. Résultats et discussion.....	66
<b>Article II : Chelh et al. Soumis à "American Journal of Physiology - Cell Physiology"</b> .....	<b>69</b>
II. <i>Article n° 2: Myostatin regulates skeletal muscle apoptosis</i> .....	70
II.1. Introduction à l'article II.....	70
II.2. Résultats et discussion.....	72
<b>Article III : Chelh et al., Soumis à "Animal "</b> .....	<b>74</b>
III. <i>Article n° 3 : Myostatin inactivation induces similar muscle molecular signature in double-muscled cattle than in mice</i> .....	75
III.1. Introduction à l'article III.....	75
III.2. Résultats et discussion.....	76
<b>Développement d'un modèle de la surexpression de MSTN in vivo</b> .....	<b>78</b>
<b>Discussion générale, Perspectives &amp; Conclusion</b> .....	<b>80</b>
I. <i>Utilisation de deux approches de génomique fonctionnelle complémentaires</i> .....	81



<i>II. Nouvelles voies biologiques cibles de la myostatine émanant des approches de génomique fonctionnelle</i>	<i>84</i>
<i>III. Pertinence biologique des cibles de la myostatine</i>	<i>87</i>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>89</b>
<b>Résumés</b>	<b>108</b>





# *Liste des publications*



### Articles scientifiques dans revues à comité de lecture

- Chelh Ilham, Meunier Bruno, Picard Brigitte, Reecy James Mark, Chevalier Catherine, Hocquette Jean-François and Cassar-Malek Isabelle. “**Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets**”. *BMC Genomics* (2009), 10:196.
- Chelh Ilham, Meunier Bruno, Picard Brigitte, Reecy James Mark, Hocquette Jean-François and Cassar-Malek Isabelle. “**Myostatin regulates skeletal muscle apoptosis**”. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, submitted.
- Chelh Ilham, Picard Brigitte, Hocquette Jean-François and Cassar-Malek Isabelle. “**Myostatin inactivation induces similar muscle molecular signature in double-muscled cattle than in mice**”. *Animal*, submitted.
- Chelh I., Rodriguez J., Bonnieu A., Cassar-Malek I., Cottin P., Gabillard J.C., Leibovitch S., Sassi H., Seiliez I., Picard B., . La myostatine : un régulateur négatif de la masse musculaire chez les vertébrés. *INRA Productions Animales* (2009) (soumis). Chelh I., Rodriguez J., Bonnieu A., Cassar-Malek I., Cottin P., Gabillard J.C., Leibovitch S., Sassi H., Seiliez I., Picard B. **La myostatine : un régulateur négatif de la masse musculaire chez les vertébrés**. *INRA Productions Animales* (2009) (soumis).
- Ilham Chelh, Philippe Gatellier and Véronique Santé-Lhoutellier. “**Characterisation of fluorescent Schiff bases formed during oxidation of pig myofibrils**”. *Meat Science* (2007), 76(2): 210-215.
- Ilham Chelh, Philippe Gatellier and Véronique Santé-Lhoutellier. “**Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination**”. *Meat Science* (2006), 74(4): 681-683.

### Communications orales et posters dans des congrès nationaux et internationaux

- Chelh Ilham, Meunier Bruno, Picard Brigitte, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek Isabelle «**Cibles de la myostatine impliquées dans l’hypertrophie musculaire chez la Souris et le Bovin**». 3ème Journées d'Animation Scientifique du Département PHASE - les 07 et 08 octobre 2009 – Tours (Poster)
- Chelh Ilham, Meunier Bruno, Picard Brigitte, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek Isabelle. «**Apoptosis is a target of myostatin loss-of-function as revealed by muscle genomics**». Avril 2009 – Marrakech – Maroc (Poster)
- Chelh Ilham, Meunier Bruno, Picard Brigitte, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek. «**Cibles du facteur de croissance myostatine impliquées dans l’hypertrophie**



**musculaire chez la Souris et le Bovin**». 12èmes Journées Sciences du Muscle et Technologies des *Viandes*. Oct. 2008 – Tours. (Com. Orale + Poster)

- Chelh Ilham, Meunier Bruno, Picard Brigitte, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek. «**Myostatin knockout alters transcriptomic and proteomic profiles of Quadriceps muscle**». 3ème Congrès International de Myologie. Mai 2008 – Marseille (Com. Orale + Poster)
- Chelh Ilham, Meunier Bruno, Picard Brigitte, Hocquette Jean-François and Cassar-Malek Isabelle. «**Muscle molecular profiles in myostatin-null mice**». Meeting COST925 (European COoperation in the field of Scientific and Technical Research) – Sep. 2007 - Viborg au Danemark. (Com. Orale)

#### Autres communications orales et posters dans le cadre de l'unité URH et de l'école doctorale SVS

- Chelh Ilham, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek Isabelle. «**Cibles de la myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire**». Journées de l'école Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. Mai. 2009 – Clermont-Ferrand (Poster)
- Chelh Ilham, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek Isabelle. «**Cibles du facteur de croissance myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire chez la Souris et le Bovin**». Conseil Scientifique de l'Unité de Recherches sur les Herbivores. INRA. Avril. 2009 – Clermont-Ferrand (Com. Orale)
- Chelh Ilham, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek Isabelle. «**Cibles du facteur de croissance myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire chez la Souris et le Bovin**». Journées de l'école Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. Avril. 2008 – Clermont-Ferrand (Com. Orale)
- Chelh Ilham, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek Isabelle. «**Cibles du facteur de croissance myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire chez la Souris et le Bovin**». Conseil Scientifique de l'Unité de Recherches sur les Herbivores. INRA. Mars. 2008 – Clermont-Ferrand (Com. Orale)
- Chelh Ilham, Hocquette Jean-François et Cassar-Malek Isabelle. «**Cibles du facteur de croissance myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire chez la Souris et le Bovin**». Conseil Scientifique de l'Unité de Recherches sur les Herbivores. INRA. Fév. 2007 – Clermont-Ferrand (Com. Orale)



# *Liste des abréviations*





4E-BP1: eIF4E binding protein 1  
ActRIIB: Activin Receptor Type IIB  
ADN: Acide Désoxyribonucléique  
ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
ALK: Activin-like Kinase  
ARN: Acide Ribonucléique  
ATP: Adénosine TriPhosphate  
BAMBI: BMP and Activin Membrane-Bound Inhibitor  
bHLH: basic Helix loop Helix  
BMP: Bone Morphogenic Factor  
Cdk: Cyclin dependant kinase  
CKI: Cyclin Kinase Independent  
Co-Smad: Co-mediator Smad  
Cy: Cyanine  
Da: Dalton  
DTT: Dithiothréitol  
E2D: Électrophorèse bidimensionnelle  
eEF: eukaryotic elongation factor  
eIF: eukaryotic initiation factor  
ERK1/2: extracellular signal-regulated kinase  
FDR: False discovery Rate  
FGF: Fibroblast Growth Factor  
FLRG: follistatin-related-gene  
Foxo: forkhead transcription factor  
GASP-1: growth and differentiation factor-associated serum protéine 1  
GDF: Growth Differentiation Factor  
GDF-8: growth and differentiation factor-8  
GH: growth hormone  
GO: Gene Ontology  
GSK: glycogen synthase kinase  
HGF: Hepatocyte Growth Factor  
hSGT: human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein  
HSP: Heat Shock Protein  
ICDH: Isocytrate Déhydrogénase  
IEF: Isoélectrofocalisation  
IGF: Insulin-like Growth Factor  
IL-6: interleukin-6  
IRS-1: insulin receptor substrate-1



I-Smad: Inhibitory Smad  
JNK: c-Jun N-terminal Kinase  
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Gene and Genome  
LAP: latency-associated peptide  
LAP: Latency-Associated Protein  
LDH: Lactate Déshydrogénase  
m/z: Rapport masse sur charge  
MAFbx: muscle atrophy F-box  
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation  
MAPK: mitogen activated protein kinase  
MAPK: Mitose Activated Protein Kinase  
MASCOT: Mini All-Sky Cloud Observation Tool  
MEC: Matrice Extracellulaire  
MEF2: Muscle Enhancer Factor 2  
mh: muscular hypertrophy  
MKK: mitogen activated protein kinase kinase 4  
MRF: Muscle Regulatory Factor  
MRF: myogenic regulatory factor  
MRF4: Muscle Regulatory Factor 4  
MS: Mass Spectrometry  
MSTN: Myostatine  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
MuRF1: muscle-specific RING-finger protein 1  
MW: Mass Weight  
MyBP: Myosin Binding Protein  
Myf5: Myogenic Factor 5  
MyHC: Myosin Heavy Chain  
MyoD: Myoblast Determination gene  
NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa-B  
NF $\kappa$ B: Nuclear factor-kappa B  
NS: N-terminal séquence  
PAK: Protein Activated Kinase  
pb: paire de bases  
pc: Post Conception  
PCR: Polymerisation Chain Reaction  
PDK1: phosphoinositide dependent kinase 1  
PEFM: Plateforme d'Exploration Fonctionnelle du Métabolisme, centre INRA de Theix  
PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 $\alpha$



PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase  
PMF: Peptide Mass Fingerprint  
PTEN: phosphatase and TENsin homolog  
RT: Reverse Transcription  
RT-PCR: reverse transcriptase – polymerase chain reaction  
S6: ribosomal protein S6  
SAM: Significance Analysis of Microarray  
SARA: Smad Anchor for Receptor Activation  
SDH: Succinate Déshydrogénase  
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis  
Shh: Sonichegehog  
siRNA: small interfering RNA  
Smurf-1: Smad Ubiquitination Regulatory Factor-1  
ST: Semitendinosus  
STRING: Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins  
Ta: *Tibialis anterior*  
TA: Tissu Adipeux  
TGF: Transforming Growth Factor  
TOF: Time Of Flight



# *Liste des illustrations*





- Figure 1: Structure du muscle, organisation des faisceaux de fibres et organisation, structure et composition de la fibre musculaire
- Figure 2: Structure d'un sarcomère
- Figure 3: Voies métaboliques caractérisant les fibres musculaires glycolytiques et oxydatives
- Figure 4: Cascade développementale et événements cellulaires au cours de la myogenèse.
- Figure 5: Myogenèse. Implication des facteurs de transcription myogéniques dans différentes étapes de la myogenèse
- Figure 6: Schéma récapitulatif de la myogenèse chez le Bovin
- Figure 7: Facteurs clés impliqués dans la régulation de la myogenèse
- Figure 8: Différentes voies impliquées dans le contrôle de la taille des fibres
- Figure 9: Différentes voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie / atrophie
- Figure 10: Différentes espèces porteuses d'une mutation naturelle de la myostatine
- Figure 11: Structure du gène de la myostatine et position des mutations responsables de l'hypertrophie chez les bovins sur le gène de myostatine
- Figure 12: Structure de la protéine myostatine
- Figure 13: Récepteurs et protéines Smad impliqués dans la voie de signalisation induite par la famille des TGF $\beta$
- Figure 14: Régulation de la transcription du gène, de l'activité de la protéine et du récepteur de la myostatine
- Figure 15: Implication de la myostatine dans la régulation de la prolifération et de la différenciation
- Figure 16: Implication de la myostatine dans la régulation de la croissance
- Figure 17: Caractéristiques musculaires des souris ko myostatine
- Figure 18: Représentation schématique de la technique de l'analyse du transcriptome utilisant des puces à ADN.
- Figure 19: Electrophorèse bidimensionnelle. Principe et image d'un gel
- Figure 20: Exemple de spots déclarés différentiellement abondants à l'aide du logiciel 'ImageMaster 2D platinum'
- Figure 21: Identification des protéines par Spectrométrie de Masse : MALDI-TOF
- Figure 22: Analyses bioinformatiques
- Figure 23: Electrotransfert de gène
- Figure 24: Analyse statistique de »s données protéomiques: test SAM
- Figure 25: Retard de différenciation contractile dans le muscle de souris Quadriceps des souris KO MSTN révélé par le profil électrophorétique des isoformes de chaînes lourdes de myosine à une semaine d'âge.
- Figure 26: Rôle clé de la GSK-3 dans différentes voies de signalisations
- Figure 27: Méthode de TUNEL associée à une contre coloration Hoechst pour révéler les noyaux apoptotiques et les noyaux totaux
- Figure 28: Coloration H.E.S (Hemalun, Eosine, Safran) et révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase sur coupes de *Tibialis anterior* après électrotransfert
- Figure 29: Aspect des muscles *Tibialis anterior* droit et gauche prélevés 7 jours après électrotransfert
- Figure 30: Originalité de la démarche suivie au cours de mes travaux de thèse.



- Figure 31: Utilisation de l'outil String pour générer un interactome entre les protéines d'intérêt et d'autres protéines appartenant à même processus biologique.
- Figure 32: Utilisation de l'outil PATHWAY STUDIO pour générer les différentes interactions entre les gènes d'intérêt appartenant à la voie PI3K/Akt et d'autres gènes appartenant au même processus biologique.
- Figure 33: Schéma de la voie Wnt canonique obtenue à l'aide de PANTHER
- Figure 34: Voies cibles de la MSTN impliquées dans l'hypertrophie musculaire révélées par l'utilisation des techniques de génomique fonctionnelle.
- Figure 35: Dans le muscle, plusieurs mécanismes d'action de la myostatine sont impliqués dans la régulation de la masse musculaire.
- Tableau 1: Caractéristiques des types de fibres musculaires
- Tableau 2: Expression de 84 gènes clés de l'apoptose chez les souris KO MSTN vs leurs témoins
- Tableau 3: Expression différentielle de IGF2 validée par qPCR
- Tableau 4: Différents paramètres électriques testés pour l'électrotransfert



# *Introduction générale*



Depuis plus de 200, ans les bovins hypermusclés dits « culards » ont été sélectionnés et multipliés pour leur intérêt économique majeur du fait de leur rendement élevé en viande. Ils présentent une hypertrophie musculaire, caractérisée par une augmentation de la masse des muscles squelettiques, en particulier de ceux de la musculature superficielle. Cette dernière est la conséquence d'une augmentation du nombre total des fibres musculaires (hyperplasie), en particulier des fibres glycolytiques rapides et dans une moindre mesure d'une augmentation de la taille des fibres (hypertrophie). Les muscles des culards sont également caractérisés par une faible teneur en collagène et en lipides intramusculaires, deux caractéristiques favorables à la tendreté de la viande bovine au détriment de sa saveur. Bien que le phénotype d'hypermuscularité « culard » soit connu depuis de très nombreuses années chez les bovins, le mécanisme génétique à la base de l'hypertrophie n'a été identifié que depuis quelques années grâce à des études conduites chez la Souris. Il s'agit en réalité de mutations "perte-de fonction" dans le gène de la myostatine (MSTN), un facteur de croissance musculaire. Ce facteur de croissance joue un rôle majeur dans l'homéostasie musculaire en contrôlant la myogenèse d'une part, et la balance atrophie/hypertrophie musculaire, d'autre part. En effet, il intervient dès la vie fœtale en contrôlant la prolifération cellulaire et donc le nombre total de fibres musculaires, tandis que pendant la vie post-natale, il régule l'activité des cellules satellites impliquées dans l'hypertrophie (augmentation de taille) des fibres musculaires. Il est également impliqué dans la fonte musculaire au cours du vieillissement. Il semblerait qu'il intervienne aussi dans le contrôle de la masse adipeuse. Si les connaissances sur ce facteur ont bien avancé au cours des dernières années, ses mécanismes d'action ne sont pas encore totalement élucidés. Notamment, l'analyse des profils moléculaires dans les muscles des bovins culards ont suggéré une régulation différentielle de l'abondance de nombreux transcrits et protéines (travaux de l'équipe Croissance et Métabolisme du Muscle de l'URH à l'INRA de Theix).

Dans le but de compléter les connaissances sur les mécanismes d'action de ce facteur de croissance obtenus au Laboratoire ou rapportés dans la bibliographie, mon travail de thèse avait pour objectif d'identifier de nouvelles cibles moléculaires de la MSTN susceptibles d'être impliquées dans l'hypertrophie musculaire. Ma thèse, débutée en octobre 2006 s'inscrit dans un programme financé par l'AFM pendant les deux premières années et dans le programme ANR "MYOTROPHY" durant la troisième année,

La stratégie initialement retenue pour la thèse consistait à analyser le phénotype moléculaire (profils protéomiques et transcriptomiques) du muscle *Quadriceps* de souris KO MSTN et de leurs témoins (collaboration avec J. Reecy de l'université Iowa, USA) afin de révéler des





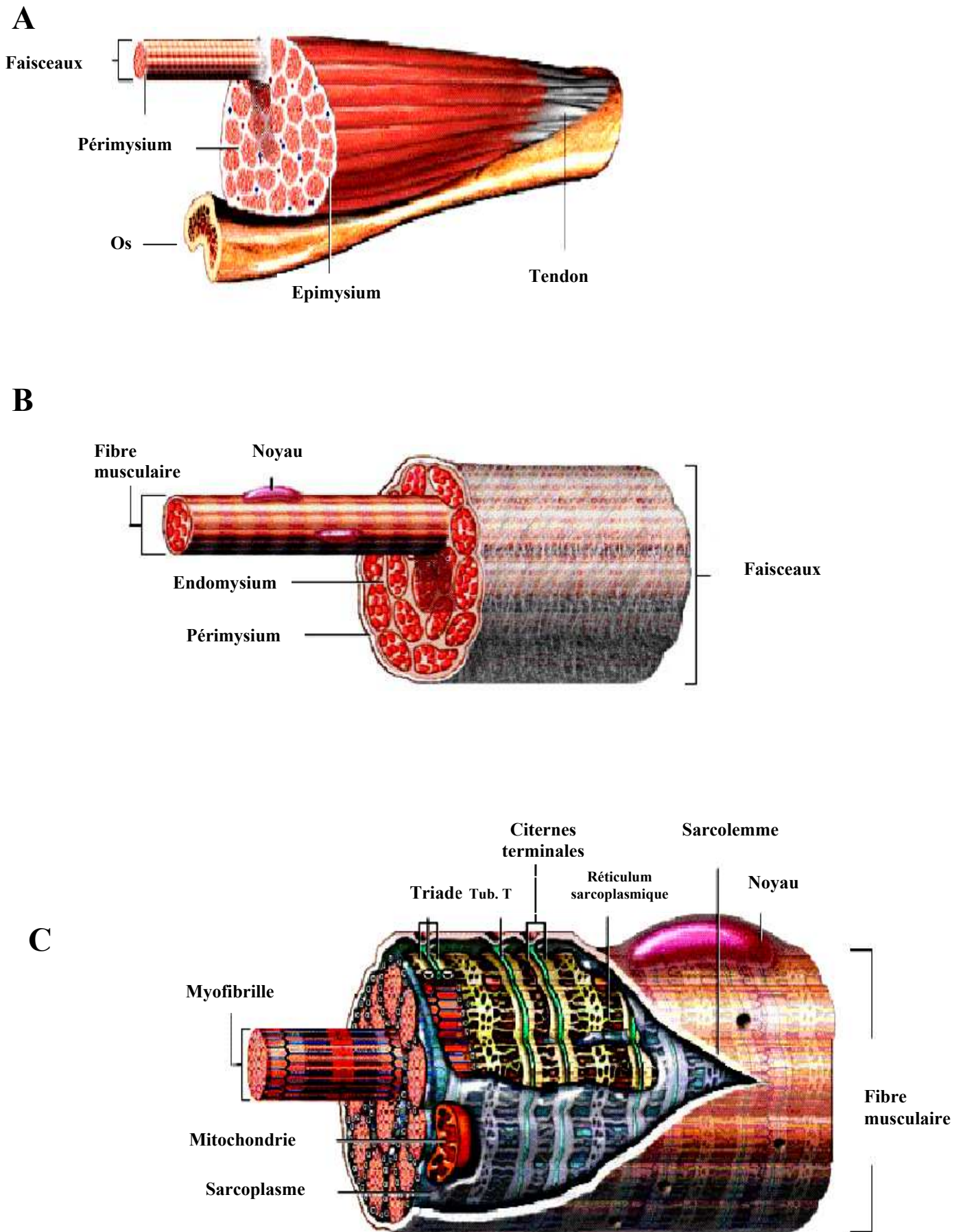
cibles potentielles de la myostatine. Une fois révélés chez les souris, les candidats susceptibles d'être des cibles en aval de la myostatine et les mécanismes associés devaient être validés chez les bovins culards.

Ce manuscrit comprend trois parties :

- Une étude bibliographique qui me permettra de faire un rappel sur les caractéristiques du muscle squelettique, la myogenèse et la régulation de la masse musculaire.
- Une deuxième partie dans laquelle je présenterai les résultats obtenus durant les trois années de ma thèse, sous forme d'articles.
- L'ensemble des résultats sera discuté dans une dernière partie, au cours de laquelle seront également présentées les perspectives offertes par ce travail.



*Introduction  
bibliographique*



**Figure 1** : Structure du muscle (A) ; Organisation des faisceaux de fibres (B) ; Organisation, structure et composition de la fibre musculaire (C).

Images téléchargées à partir de [http:// www. emc. maricopa. edu. html](http://www.emc.maricopa.edu.html)

## I. Le tissu musculaire squelettique, un tissu hétérogène et très spécialisé

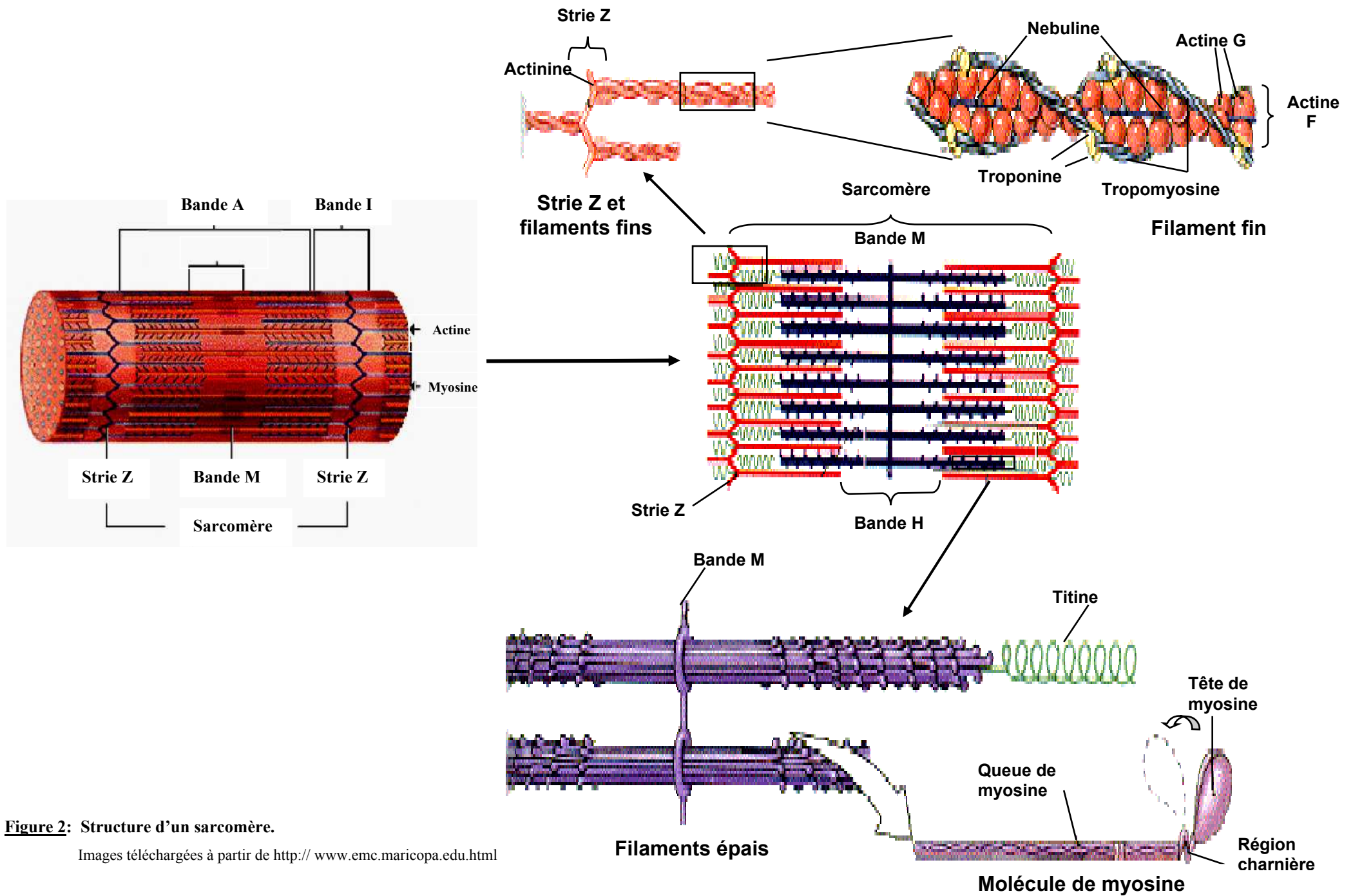
Le muscle squelettique représente environ 40 % de la masse totale corporelle. C'est un tissu hétérogène et très organisé, propriété essentielle pour ses fonctions, notamment le maintien de la posture, le dégagement de la chaleur résultant de l'activité musculaire et la production du mouvement par la génération des forces sur les structures osseuses *via* les tendons. C'est également le principal réservoir protéique de l'organisme et un acteur essentiel dans le métabolisme corporel. Il contribue largement à la santé par son rôle dans le maintien de l'homéostasie des protéines. L'altération de cette fonction conduit à la perte de la masse musculaire encore appelée atrophie musculaire. Ce phénomène peut survenir au cours du vieillissement et dans certain nombre de pathologies comme par exemple le cancer et la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).

Chez les espèces d'intérêt agronomique, le muscle squelettique est le précurseur de la viande. La transformation du muscle en viande se produit dès la mort de l'animal et se déroule en plusieurs phases (l'état pantelant, la phase d'installation de la rigidité cadavérique ou *Rigor mortis* et la phase de maturation). Pendant la maturation, le muscle subit un ensemble de modifications structurales et biochimiques (sous l'action de plusieurs systèmes enzymatiques) (Valin, 1985, Goll *et al.*, 1989) qui conditionnent finalement les qualités organoleptiques de la viande et en particulier sa tendreté (Got, 1997).

### I.1. Plusieurs compartiments tissulaires

Le muscle squelettique est composé de cellules musculaires cylindriques (**figure 1**) (encore appelées fibres musculaires) ainsi que de cellules conjonctives, d'adipocytes, de cellules nerveuses et sanguines. Les fibres musculaires, responsables de la contraction, s'associent en faisceaux entourés par une enveloppe de tissu conjonctif appelée périmysium, chaque fibre étant elle-même entourée par une enveloppe appelée endomysium. L'ensemble du tissu musculaire est recouvert d'une trame conjonctive externe appelée épimysium (**figure 1**).

Les principales protéines constitutives du tissu conjonctif sont les collagènes (Walls, 1960). La famille des collagènes représente 25% des protéines totales du muscle et 2 à 7 % du poids sec du muscle. Ces protéines sont stabilisées par des liaisons covalentes (ponts disulfures ou hydrogènes) reliant les chaînes de collagènes entre elles et aussi aux autres composants de la



**Figure 2: Structure d'un sarcomère.**

Images téléchargées à partir de <http://www.emc.maricopa.edu.html>

matrice extracellulaire (Voermans *et al.*, 2008), ceci leur attribue un rôle important dans le maintien de l'intégrité structurelle du tissu musculaire. Le collagène confère notamment à la viande, issue de la transformation *post-mortem* du muscle, des propriétés particulières à savoir la résistance mécanique et la résistance thermique.

Au sein du tissu musculaire, on distingue aussi le tissu adipeux (TA) intermusculaire et le TA intramusculaire. Le TA est constitué à la fois de lipides de structure tels que les phospholipides et de lipides de réserve ou triglycérides. Ces triglycérides sont stockés dans des vacuoles lipidiques dans les adipocytes. Ces derniers sont présents entre les faisceaux des fibres musculaires pour le TA intramusculaire et dans la trame du tissu conjonctif intermusculaire pour le TA intermusculaire.

## I.2. La fibre musculaire et ses propriétés

La fibre musculaire est une cellule plurinucléée, d'un diamètre compris entre 10 et 100  $\mu\text{m}$ , et d'une longueur qui peut atteindre 60 cm. Elle est entourée par une membrane appelée sarcolemme et présente la particularité d'avoir un appareil contractile très spécialisé. Une grande majorité de l'espace intracellulaire, appelé encore sarcoplasme, est occupé par des myofibrilles pour environ 80% du volume de la cellule. La myofibrille est l'unité contractile du muscle. Elle est constituée de myofilaments (figure 2). L'unité fonctionnelle des myofibrilles est appelée sarcomère; ce dernier est compris entre deux stries Z successives. Au sein de la myofibrille, les myofilaments forment une alternance de stries claires (bandes I) et foncées (bandes A) traduisant l'existence de deux sortes de filaments: les filaments fins constitués d'actine, de tropomyosine et de troponine et les filaments épais constitués de myosine. Les filaments d'actine sont présents de part et d'autre de la strie Z. La bande I correspond à la partie du sarcomère qui ne renferme que les filaments d'actine. La bande A correspond à la région où se chevauchent les filaments d'actine et de myosine. La région où l'on ne trouve que des filaments de myosine s'appelle la zone H. La partie centrale de la bande A constitue la ligne M, cette dernière se présente sous l'aspect d'un épaississement des filaments de myosine (figure 2).

### I.2.1. Propriétés contractiles

Le sarcoplasme, cytoplasme de la cellule musculaire, est composé majoritairement d'eau (environ 75 %) et il contient aussi des organites intracellulaires, notamment les noyaux, les



**Tableau 1:** Caractéristiques des types de fibres musculaires.

Types de fibres		Isoformes de chaîne lourde de myosine	Vitesse de contraction	Métabolisme	Activité ATPasique
Lente	I	I	Lente	Oxydatif	Faible
Rapide	IIA	IIa	Rapide	Oxydo-glycolytique	Forte
	IIX	IIx		Oxydo-glycolytique	
	IIB	IIb		Glycolytique	

mitochondries et les réticulums sarcoplasmiques, ainsi que des protéines. Une majorité de ces protéines sont des protéines myofibrillaires impliquées dans l'appareil contractile, des enzymes participant au métabolisme cellulaire ainsi que la myoglobine, impliquée dans le stockage de l'oxygène. Le sarcoplasme contient également du glycogène, des acides gras et d'autres molécules nécessaires au métabolisme énergétique comme l'ATP (Pollack, 1990).

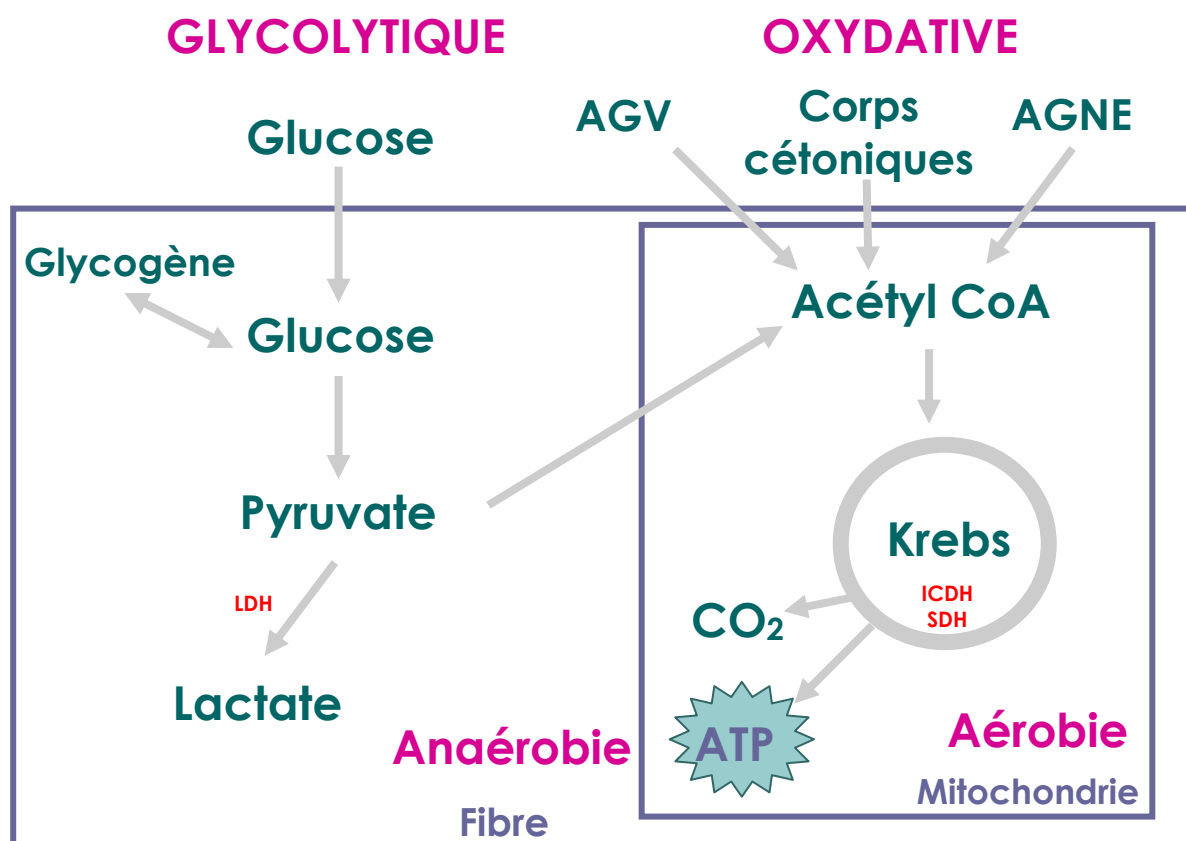
Comme nous l'avons vu précédemment, l'actine, la tropomyosine et les troponines constituent les myofilaments fins. La protéine la plus abondante est l'actine (20-25% des protéines myofibrillaires totales). C'est une protéine globulaire dont le diamètre est de 55 Å et qui contient un acide aminé rare, la 3-méthyl histidine. L'actine (poids moléculaire, PM, 43 kDa) est constituée d'une chaîne polypeptidique de 376 acides aminés.

La myosine, le constituant les myofilaments épais, représente 48% des protéines myofibrillaires totales. C'est une protéine dimérique de poids moléculaire 470 kDa (figure 2) qui comprend deux longues chaînes identiques (chaînes lourdes, MyHC, de PM 200 kDa) auxquelles sont associées des chaînes légères beaucoup plus courtes au nombre de deux par MyHC et portant l'activité ATPasique (leur PM étant compris entre 16 et 18 kDa). Il existe plusieurs isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC): myosine E (embryonnaire), F (néonatale ou foetale), I (lente) et IIa, IIb ou IIx (rapide). La myosine prédominante détermine le type de fibre parmi les types lents (I), rapides oxydo-glycolytiques (IIa) ou rapides (IIb ou IIx). La myosine a deux propriétés importantes pour la contraction: d'une part, elle possède une propriété ATPasique qui est activée par les ions calcium et d'autre part, elle se lie à l'actine pour former un complexe: *l'actomyosine* ; c'est le sous fragment S-1, correspondant à la tête de la molécule qui possède ces deux propriétés.

La mesure de l'activité ATPasique de la myosine (Brooke et Kaiser 1970) ou la séparation des des isoformes des chaînes lourdes de myosines par la technique d'électrophorèse permettent de distinguer les propriétés contractiles des fibres musculaires et de les classer (Schiaffino *et al.*, 1989, Gorza, 1990, Picard, 1998, Duris *et al.*, 1999). Les fibres de type I (lentes) et celles de type IIA, IIX et IIB (rapides) expriment respectivement les isoformes MyHC I, et IIa, IIx et IIb (tableau 1). L'immunohistochimie permet également de distinguer des fibres hybrides en particulier les fibres IIC qui contiennent à la fois les isoformes MyHC I et IIx.

En plus de ces isoformes adultes de myosines, d'autres isoformes ont été mises en évidence chez le fœtus: MyHC embryonnaire, foetale et alpha-cardiaque (Weydert *et al.*, 1987, Picard *et al.*, 1995, Gagnière *et al.*, 1999a).

Les isoformes de MyHC sont mises en place au cours de développement musculaire selon une cinétique particulière. Chez le bovin par exemple, les isoformes embryonnaires et foetaux de



**Figure 3 :** Voies métaboliques caractérisant les fibres musculaires glycolytiques et oxydatives.

MyHC disparaissent progressivement au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de vie foetale. En revanche à partir du deuxième trimestre de la vie fœtale, les isoformes rapides adultes (IIa et IIx) remplacent progressivement les isoformes développementales durant le dernier tiers de gestation (Picard et al., 1994; Robelin et al., 1993). Trois semaines après la naissance, toutes les fibres ne contiennent plus que les isoformes de MyHC adultes (Duris, 1999).

### I.2.2. Propriétés métaboliques

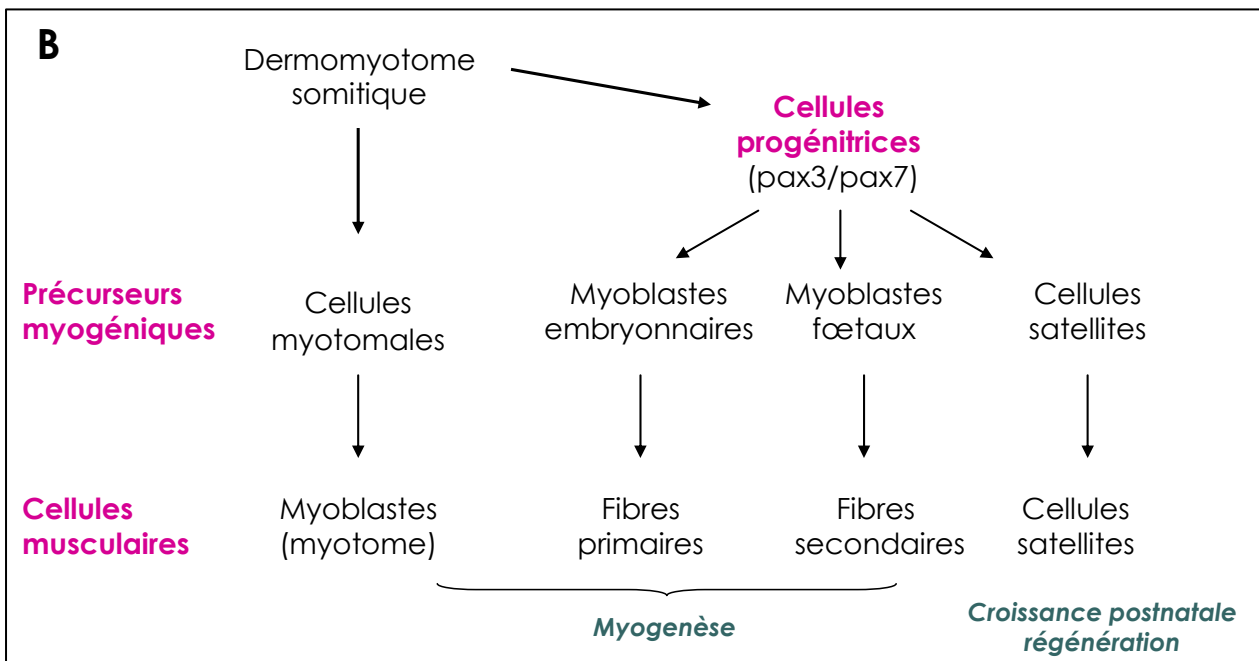
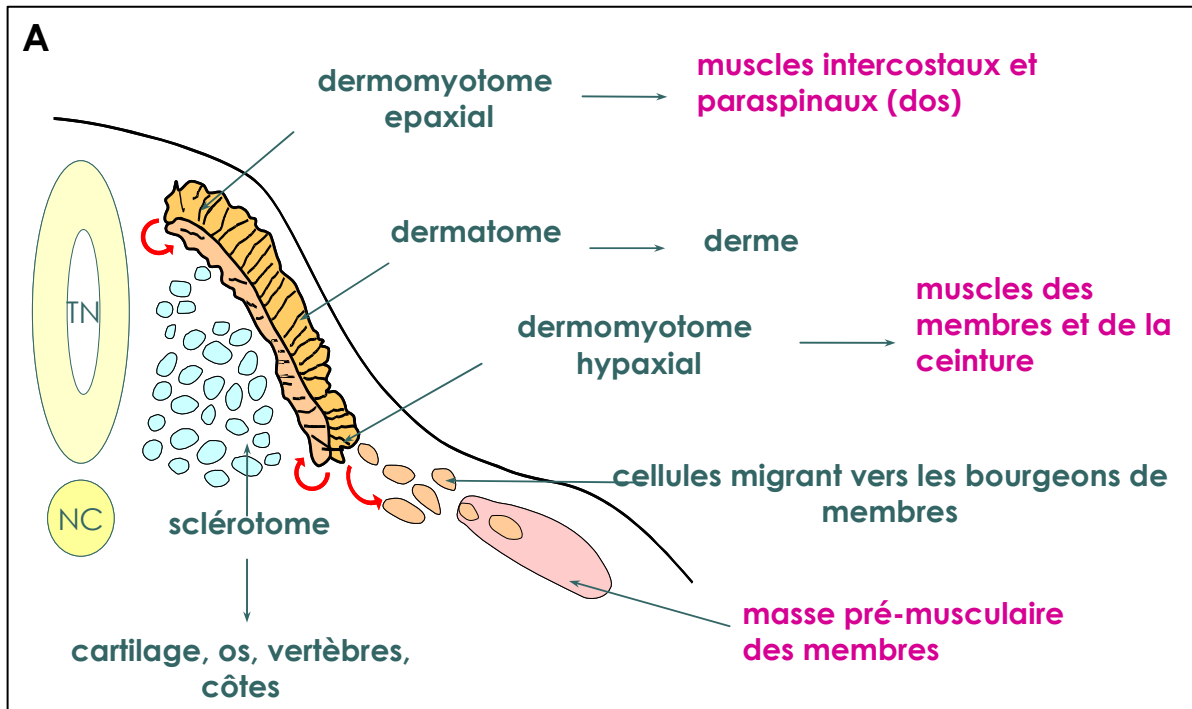
Les fibres musculaires sont aussi distinguées selon leur type métabolique (oxydatif ou glycolytique) (figure 3). Il existe deux types majeurs de fibres : les fibres oxydatives (fibres type I) et les fibres glycolytiques (fibres type II) (tableau 1).

La mesure des activités enzymatiques est souvent utilisée afin de déterminer le type métabolique des fibres musculaires; Par exemple, l'activité de l'enzyme isocitrate déshydrogénase (ICDH) ou l'enzyme succinate déshydrogénase (SDH), deux enzymes mitochondriales du cycle de KREBS sont utilisées pour caractériser le métabolisme oxydatif aérobie de la fibre musculaire. Celle de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), une enzyme qui catalyse la conversion réciproque de pyruvate et de lactate lors de la glycolyse anaérobie est utilisée pour caractérisée le métabolisme glycolytique anaérobie (Robelin *et al.*, 1993, Gagnière *et al.*, 1999b).

La capacité oxydative des fibres musculaires a une relation inverse avec le diamètre de la fibre. Le diamètre des fibres de type I est le plus petit alors que les fibres de type IIB ont un diamètre le plus grand et les fibres de type IIA ont un diamètre intermédiaire (Cassens *et al.*, 1971).

Le métabolisme oxydatif est prédominant au cours de la vie fœtale et cette tendance s'inverse au cours de la période néonatale (Hocquette *et al.*, 1998; Gargnière *et al.*, 1999).

*Les fibres musculaires présentent une hétérogénéité, elles se distinguent par leur taille et par leurs propriétés contractiles et métaboliques et donc par les protéines spécifiques qu'elles s'expriment.*



**Figure 4. Cascade développementale et évènements cellulaires au cours de la myogenèse.**

- A.** Origine embryonnaire des muscles squelettiques dérivés du mésoderme paraxial.
- B.** Des vagues successives de précurseurs myogéniques contribuent à la formation du muscle et à la diversification des fibres musculaires. Les différentes générations de myoblastes dérivent du dermomyotome et conduisent à la formation de différents types de fibres musculaires. (Adaptée de Biressi et al., 2007).

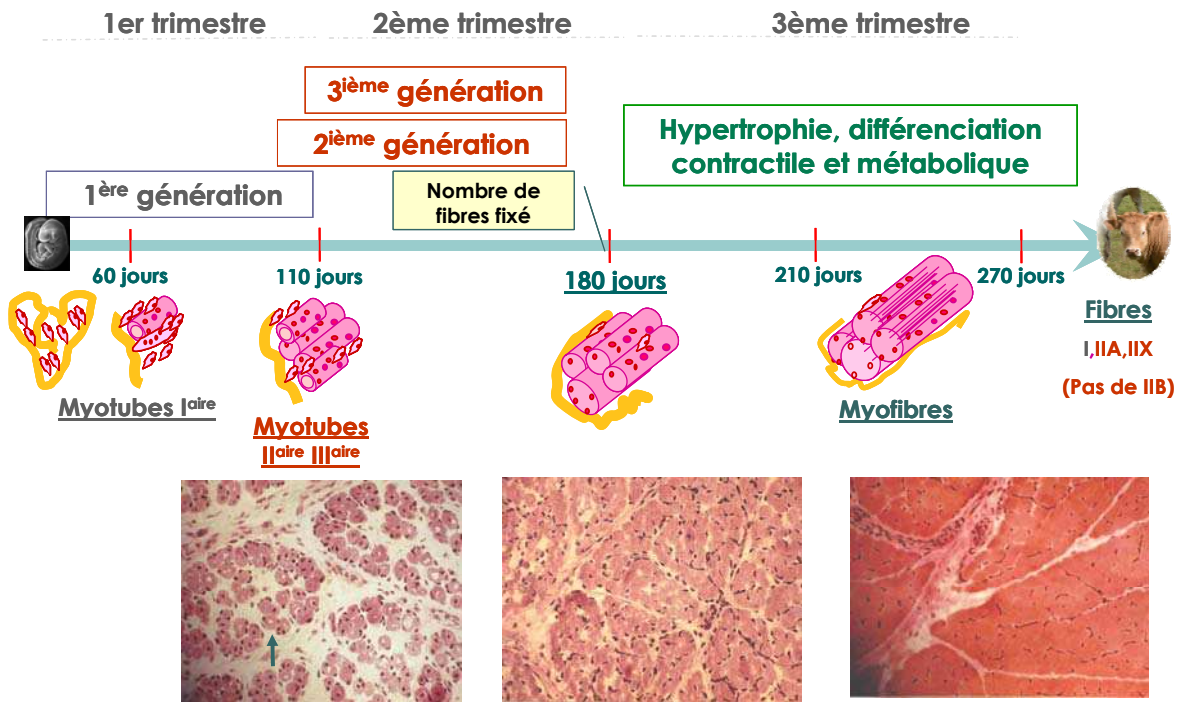
## II. La myogenèse

### II.1. Une succession d'étapes bien orchestrée

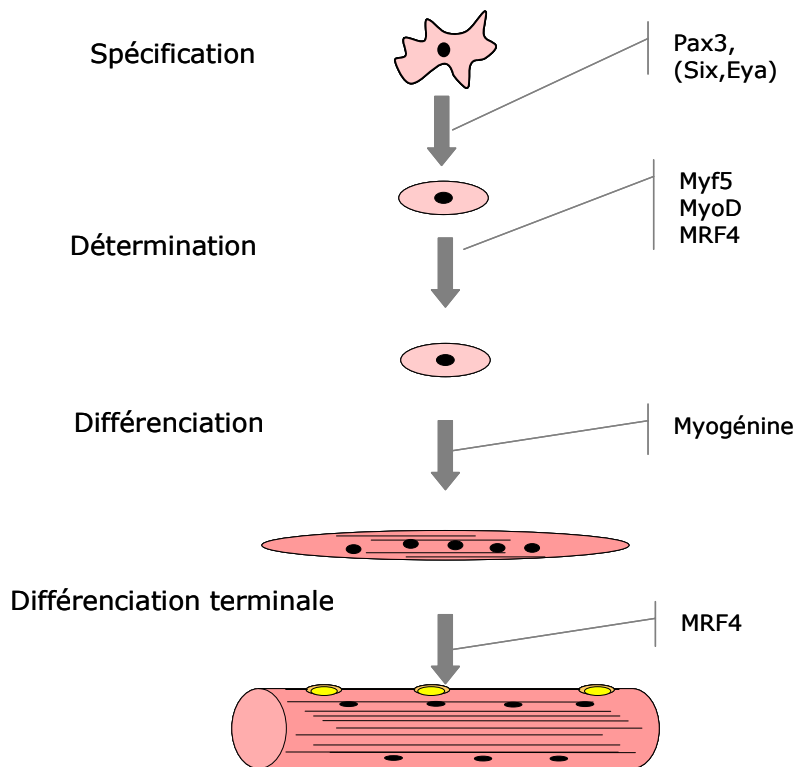
Le processus qui permet la formation du muscle squelettique est appelé la myogenèse. La musculature squelettique du tronc et celle de la tête dérivent respectivement du mésoderme paraxial et du mésoderme para-axial crânial (pour revue (Biressi *et al.*, 2007, Bryson-Richardson and Currie, 2008, Tzahor, 2009). Très tôt au cours du développement embryonnaire des vertébrés, les cellules du mésoderme se différencient en cellules progénitrices du muscle squelettique. A la fin de la somitogenèse, certains progéniteurs issus du dermomyotome (dérivé de la partie dorsale des somites) donnent naissance à des myoblastes mononucléés. Ceci est à l'origine du muscle fœtal primordial, appelé myotome, localisé sous le dermomyotome (figure 4A). La région dorso-médiane du dermomyotome se différencie pour former la musculature paraxiale (ou épaxiale) à l'origine des muscles du tronc (intercostaux et paraspinaux). La région ventro-latérale va former la musculature hypaxiale (muscles des membres, de la ceinture, du diaphragme et de la langue) à partir d'une population de cellules progénitrices qui migre depuis le dermomyotome.

La myogenèse se déroule selon une série d'étapes successives, mais chevauchantes, et fait intervenir plusieurs types cellulaires (cellules myotomales, myoblastes embryonnaires et fœtaux, et cellules satellites) (figure 4B). Ceci a pour conséquence l'hétérogénéité et la diversification des fibres musculaires, comme cela sera présenté dans le paragraphe suivant.

Les événements cellulaires ont été bien décrits au cours de la myogenèse. Les myoblastes prolifèrent, puis quittent d'une manière irréversible le cycle cellulaire et deviennent amitotiques (Kenny-Mobbs and Thorogood, 1987). Ils s'alignent les uns par rapport aux autres et fusionnent pour former les myotubes précurseurs des fibres musculaires. Dans les myotubes, les noyaux sont en position centrale et les myofibrilles en périphérie. Lors de la différenciation terminale, les myotubes se différencient en fibres dans lesquelles les noyaux se relocalisent en périphérie. L'appareil contractile (correspondant majoritairement aux protéines contractiles actine et myosine) occupe alors progressivement la majorité du cytoplasme.



**Figure 5:** Schéma récapitulatif de la myogenèse chez le Bovin. (d'après Picard *et al.*, 2002).



**Figure 6:** Implication des facteurs de transcription myogéniques dans différentes étapes de la myogenèse

## II.2. Plusieurs générations de fibres à l'origine de la diversité des fibres musculaires

La myogenèse est caractérisée par la mise en place séquentielle de plusieurs générations de cellules comme elle a été bien décrit chez les vertébrés (Evans *et al.*, 1994, Duris *et al.*, 1999, Picard *et al.*, 2002, Wigmore and Evans, 2002). Chez le Bovin par exemple (figure 5), une première vague de myoblastes est observée dès le premier tiers de la vie fœtale (à 30 jours; (Duris *et al.*, 1999). Ces myoblastes, encore appelés myoblastes primaires ou embryonnaires, fusionnent pour donner des myotubes primaires qui seront à l'origine des fibres lentes principalement dans les muscles lents (Stockdale and Miller, 1987). Les myoblastes primaires voient leur nombre diminuer vers la fin de la période embryonnaire et ne représentent qu'une faible proportion du nombre total des fibres chez l'adulte.

Une deuxième vague de myoblastes, dite de seconde génération ou myoblastes fœtaux, apparaît dès le deuxième tiers de la vie fœtale chez le Bovin (entre 90 et 100 jours de gestation, (Duris *et al.*, 1999). Elle est à l'origine en majorité des fibres rapides dans les muscles rapides mais également des fibres lentes dans les muscles lents ou mixtes (Stockdale and Miller, 1987). Ces myotubes secondaires se développent autour des gros myotubes primaires moins nombreux et qui leur servent de support. Ceci est particulièrement observable chez le porc, espèce dans laquelle une disposition en rosettes de ces deux générations de fibres a été observée (Lefaucheur *et al.*, 1995).

Une troisième génération de myoblastes a été mise en évidence chez les bovins à 41 % de la vie fœtale (à partir de 110 jours ; (Duris *et al.*, 1999) et elle donne naissance aux fibres IIA et IIC observées à la naissance. Ces cellules vont venir se placer autour des myotubes primaires et au voisinage des myotubes secondaires. Cette génération a été décrite également chez l'Homme (Draeger *et al.*, 1987), le Mouton (Wilson *et al.*, 1992) et le Porc (Mascarello *et al.*, 1992, Lefaucheur *et al.*, 1995) mais elle n'a jamais été observée chez les espèces de petite taille telles que la Souris et le Rat. La présence de cette troisième génération de myoblastes laisse suggérer un rôle dans le développement de masses musculaires plus importantes chez les animaux de grande taille (Lefaucheur *et al.*, 1995).

## II.3. Régulation de la myogenèse

Comme cela sera présenté au cours de ce chapitre, de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques régulent la détermination, la migration et la différenciation des cellules myogéniques (figure 6).





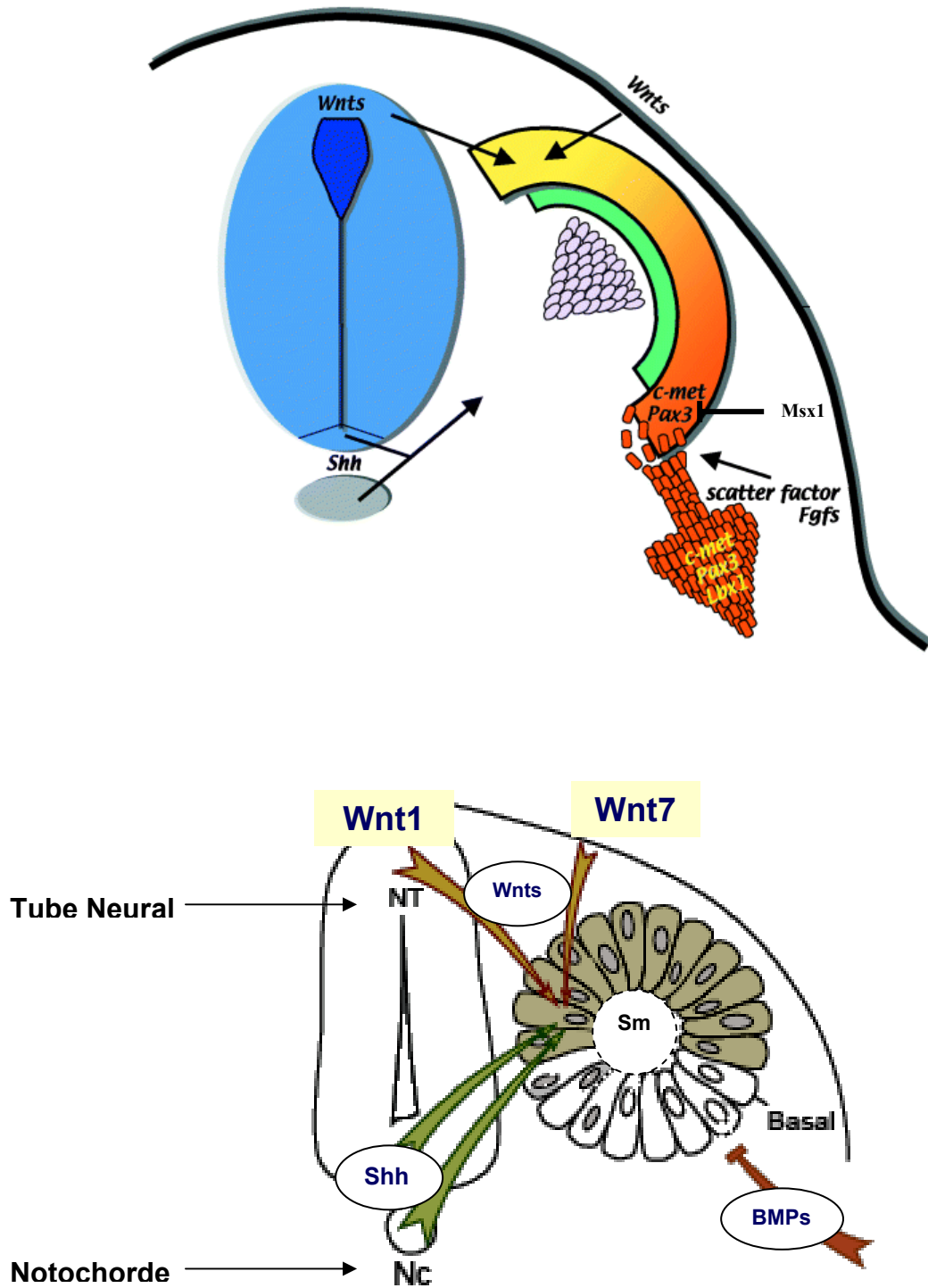
### II.3.1. Les facteurs myogéniques

Les facteurs régulateurs de la myogenèse (MRFs) sont des facteurs de transcription spécifiques du muscle squelettique, au nombre de quatre : MyoD (Myogenic determination factor D), Myf-5 (Myogenic factor 5), myogénine et MRF4 (Buckingham, 1992). Ces facteurs appartiennent à une famille de facteurs de transcription à motif bHLH (basic Helix-Loop-Helix). Les facteurs myogéniques forment des homodimères ou des hétérodimères avec autres facteurs de transcription de type HLH. Ils interagissent avec d'autres protéines ubiquitaires de type bHLH, connue sous le nom E-protéines, en particulier E12 et E47 (Lassar *et al.*, 1991). Les MRFs interagissent également avec d'autres facteurs de transcription myogéniques, tels que les membres de la famille MEF (Muscle Enhancer Factor) (décrits par la suite dans le paragraphe "Différenciation") pour activer spécifiquement l'expression des gènes musculaires (Cserjesi and Olson, 1991, Black and Olson, 1998). Après leur dimérisation, les MRFs se lient à une séquence de nucléotides constituant la région E-box 5'-GAGCTG-3' (boîte E) située dans le promoteur d'un certain nombre de gènes cibles (Edmondson et Olson, 1993) tels que, par exemple, le gène codant la p21 qui est responsable de l'interruption du cycle cellulaire (Walsh and Perlman, 1997) et celui de la MyHC (Muroya *et al.*, 2002).

Ces facteurs sont exprimés lors du développement embryonnaire au niveau des somites et plus tardivement au niveau des myoblastes dans les bourgeons des membres (Sassoon *et al.*, 1989, Bober *et al.*, 1991, Hinterberger *et al.*, 1991, Tajbakhsh *et al.*, 1996). Myf-5 et MyoD présentent une grande homologie entre eux et sont exprimés au niveau des myoblastes avant leur différenciation (Braun *et al.*, 1992, Rudnicki *et al.*, 1992). Ils sont importants pour la détermination et la survie des cellules progénitrices musculaires. Les facteurs myogénine et MRF4 sont exprimés au niveau des somites et plus tardivement au niveau des bourgeons des membres; ils sont impliqués dans la migration, la différenciation des myoblastes et leur maintien (figure 6) (Hasty *et al.*, 1993, Nabeshima *et al.*, 1993, Patapoutian *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 1995).

Récemment, il a été également montré que MRF4, comme Myf5 et MyoD, joue un rôle important dans la détermination myogénique, puisque toutes les masses musculaires et myoblastes sont éliminées chez des souris triple mutantes Myf5<sup>-/-</sup>, MyoD<sup>-/-</sup> et MRF4<sup>-/-</sup> (Kassar-Duchossoy *et al.*, 2004).

Certains des mécanismes qui conduisent à l'activation des MRFs au cours de la myogenèse ont été élucidés. Dans le somite, la spécification des progéniteurs musculaires hypaxiaux est



**Figure 7: Facteurs clés impliqués dans la régulation de la myogenèse**

Les signaux Wnt contrôlent l'induction de la morphogenèse du tissu musculaire Shh est nécessaire pour le maintien et la prolifération des cellules de la région épaxiale

médiée par Pax3 (Buckingham and Relaix, 2007), un membre de la famille de facteurs de transcription « paired box ». Pax3 est un régulateur en amont de la cascade myogénique (figure 6) qui est requis pour la myogenèse précoce (Tajbakhsh *et al.*, 1997) et le développement des muscles du tronc. Ce facteur pourrait activer l'expression de Myf5 directement en se fixant sur des sites de liaison dans la séquence « enhancer » de Myf5 (Bajard *et al.*, 2006). La double inactivation de Myf5/Pax3 chez la Souris a permis de montrer que ces deux gènes contrôlent l'activation de MyoD dans le tronc (Tajbakhsh *et al.*, 1997). Pax3 est également susceptible de contrôler indirectement la myogenèse par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription comme les membres de la famille Six et leurs cofacteurs Eya et Dach (voir(Buckingham and Relaix, 2007). Ainsi, une voie myogénique dépendante de Pax3 et une voie dépendante de Myf5 sont requises respectivement pour la myogenèse précoce dans le muscle hypaxial et le muscle epaxial. Il a été montré par ailleurs que des mécanismes différents sont mis en jeu pour la spécification des lignages musculaires dans la tête. Alors que Pax3 et MRF4 ne sont pas nécessaires pour myogenèse dans le crâne, des combinaisons différentes de facteurs de transcription (par exemple, impliquant Tcf21, MyoR, Txb1, pitx2, ISL1 et Nkx2.1) interviendraient en amont de MyoD et Myogénine pour spécifier les différents muscles crânio-faciaux (Tzahor, 2009). Dans le muscle post-natal, Pax3 et Pax7 (un autre membre de la famille « paired box ») régulent le programme myogénique dans les cellules satellites en activant MyoD (Relaix *et al.*, 2006). Plus précisément, l'expression de Pax7 est requise pour la spécification des cellules satellites (Seale *et al.*, 2000) et la survie des cellules satellites (Relaix *et al.*, 2006).

### II.3.2. Induction de la myogenèse

Plusieurs facteurs exprimés lors du développement embryonnaire sont importants pour la formation des somites et pour la détermination des lignées cellulaires myogéniques (figure 7). A ce titre, ils jouent un rôle crucial dans la régulation de la myogenèse.

Sonic hedgehog (Shh), membre de la famille Hedgehog exprimé par la notochorde et le plateau du tube neural et les facteurs Wnts (*Wingless*), produits par la partie dorsale du tube neural et la surface de l'ectoderme ont un rôle positif dans l'induction de la myogenèse. Il a été montré que l'expression du facteur Myf5 serait induite par Shh et par Wnt-1 et celle de MyoD serait induite par le Wnt-7a dans les muscles épaxiaux (Tajbakhsh *et al.*, 1998, Borycki *et al.*, 1999).



Les BMPs (*Bone morphogenetic proteins*) appartenant à la famille des TGF- $\beta$  (*Transforming growth factors  $\beta$* ), sont également connus pour réguler négativement la myogenèse. Un faible taux de BMP dans le bourgeon de membre maintient la migration, l'expression de Pax3 dans les cellules myogéniques précurseurs en prolifération et inhibe la myogenèse (Amthor *et al.*, 1998). En revanche, à des concentrations élevées, BMP-2, -4 et -7 induisent la mort cellulaire. L'implication d'autres membres de la famille des TGF- $\beta$  et de FGF dans l'induction de la myogenèse a été aussi décrite. Une étude a montré que TGF- $\beta$ 1, membre de la superfamille des TGF- $\beta$ , serait impliqué dans l'induction de la myogenèse tandis que le bFGF (basic fibroblast growth factor) active la prolifération et la survie cellulaire (Stern *et al.*, 1997). D'autres protéines comme Notch pourraient aussi jouer un rôle dans la régulation de la myogenèse en régulant l'expression de Myf-5 et MyoD. En effet, une sur-expression de la protéine Notch dans le cytoplasme inhibe la myogenèse (Kopan *et al.*, 1994).

### II.3.3. Migration des myoblastes

Lors de la myogenèse, les cellules progénitrices et les cellules myogéniques expriment Pax-3. Le développement des muscles des membres est dépendant de l'expression de gène Pax-3 (Buckingham *et al.*, 2003, Venters *et al.*, 2004). La migration des cellules myogéniques implique d'autres facteurs, à savoir le facteur HGF/SF (scatter factor/ hepatocyte growth factor) et son récepteur, la protéine c-Met (une protéine tyrosine kinase). En effet, chez la Souris, une mutation homozygote du facteur HGF/SF ou de c-Met, conduit à une absence de migration des cellules dans les bourgeons de membres (Bladt *et al.*, 1995). Lbx1 (ladybird homeobox homolog 1) est également un marqueur de la migration des cellules exprimant Pax-3 (Mennerich *et al.*, 1998, Buckingham, 2001). L'expression de Pax-3 pourrait être concomitante avec celle de Msx1 (msh homeobox 1), antagoniste de l'activité de Pax-3, conduisant ainsi à l'inhibition la migration myogénique (Bendall *et al.*, 1998) (figure 7).

### II.3.4. Différenciation

*Cycle cellulaire.* Lors de la différenciation terminale, les myoblastes sortent du cycle cellulaire, cette étape est caractérisée par une augmentation de l'expression des inhibiteurs des cyclines/cdk et de la protéine rétinoblastome p53 (Walsh and Perlman, 1997). Cependant, la surexpression de la cycline D1, protéine importante pour la transition G1-S, et l'augmentation de l'activité des kinases cyclines/cdk inhibent la myogenèse (Skapek *et al.*, 1996, Walsh and



Perlman, 1997). De ce fait, l'augmentation de l'expression des inhibiteurs des cyclines au moment de la différenciation terminale est importante pour la résistance des myoblastes à l'apoptose (Wang and Walsh, 1996), la stabilité de MyoD (Reynaud *et al.*, 1999) et pour l'induction de la myogénine préalable à la différenciation (Zhang *et al.*, 1999).

*Voies de transduction des facteurs de croissance.* Lors de la myogenèse, de nombreuses kinases et phosphatases sont activées suite à une stimulation par des facteurs de croissance, comme par exemple l'IGF (Insuline like growth factor). Ces protéines régulent positivement ou négativement la différenciation en contrôlant la transcription des gènes musculaires, cibles des MRFs.

Ainsi, la protéine PI3K, un constituant central de la voie PI3K/Akt, entraîne une sur-expression de la p21 (inhibiteur de cyclines), et donc la sortie des myoblastes du cycle cellulaire. La protéine Akt serait également régulateur de la survie cellulaire *via* l'inhibition de l'apoptose durant la différenciation myogénique (Fujio *et al.*, 1999).

D'autres kinases et phosphatases interviennent dans la régulation de la différenciation. C'est le cas des constituants de la voie MEK, connue pour son rôle dans l'inhibition de la différenciation des cellules myogéniques *via* son activation par FGF-2 et IGF-1 (Weyman and Wolfman, 1998). *A contrario*, la MAPK phosphatase est un antagoniste de la voie MEK, inhibant la MAPK Erk simultanément à l'activation de la transcription des gènes muscles-spécifiques (Bennett and Tonks, 1997). La MAPK phosphatase aurait donc un rôle positif dans la régulation de la différenciation.

*Famille de Mef2.* La famille des facteurs de transcription Mef2 (myocyte enhancer factor 2) joue un rôle régulateur dans la myogenèse (pour revue : Black et Olson,(1998); Naya et Olson,(1999). Elle comprend quatre membres appelés Mef2A, B, C et D. Ces facteurs interagissent avec les MRFs pour induire l'expression de gènes spécifiques du muscle. Ils forment une boucle auto-régulatrice avec les MRFs. Par exemple, il existe une cascade d'activation de la transcription par laquelle Mef2, une fois induit par myogénine, régule positivement la transcription de myogénine (Edmondson *et al.*, 1992). Ainsi, l'activation des promoteurs des facteurs MRFs, notamment MRF4 et myogénine, facteurs impliqués dans la différenciation, nécessite à la fois les facteurs MRFs et Mef2 (Naidu *et al.*, 1995).

*Myostatine.* Une étude récente de Manceau et al., (2008) a montré l'implication de la myostatine, membre de la famille des TGF- $\beta$ , *in vivo* dans la régulation de la balance entre la





prolifération des cellules progénitrices myogéniques et leur différenciation en activant leur différenciation terminale.

### II.3.5. Croissance musculaire et régénération

Dans le muscle adulte, environ 5% des myoblastes restent indifférenciés: ce sont les cellules satellites. Ces cellules sont mononucléées, quiescentes et sont localisées entre la lame basale et la membrane plasmique des myofibrilles (Hawke and Garry, 2001). Leur nombre diminue avec l'âge. Chez la Souris, elles représentent 32% à la naissance pour atteindre environ 5% à l'âge adulte (à 2 mois ; Biscoff, 1994). Les cellules satellites jouent un rôle crucial dans la croissance musculaire car elles participent au phénomène de croissance hypertrophique des fibres musculaires. En effet, les cellules satellites subissent une division asymétrique, une cellule reste quiescente et la deuxième fusionne avec la fibre musculaire apportant ainsi son noyau (Webster and Blau, 1990).

Plusieurs facteurs ont été décrits pour être spécifiquement exprimés par les cellules satellites. Les cellules satellites sont caractérisées par l'expression du gène Pax7, un facteur de transcription à homéodomaine de type «paired-box». Elles sont absentes chez des souris *pax7*<sup>-/-</sup>, ce qui suggère que ce facteur de transcription est un marqueur des cellules satellites, et que sa présence est cruciale pour leur survie. La surexpression de *pax7* favorise la sortie du cycle cellulaire, même en condition de prolifération (Olguin and Olwin, 2004).

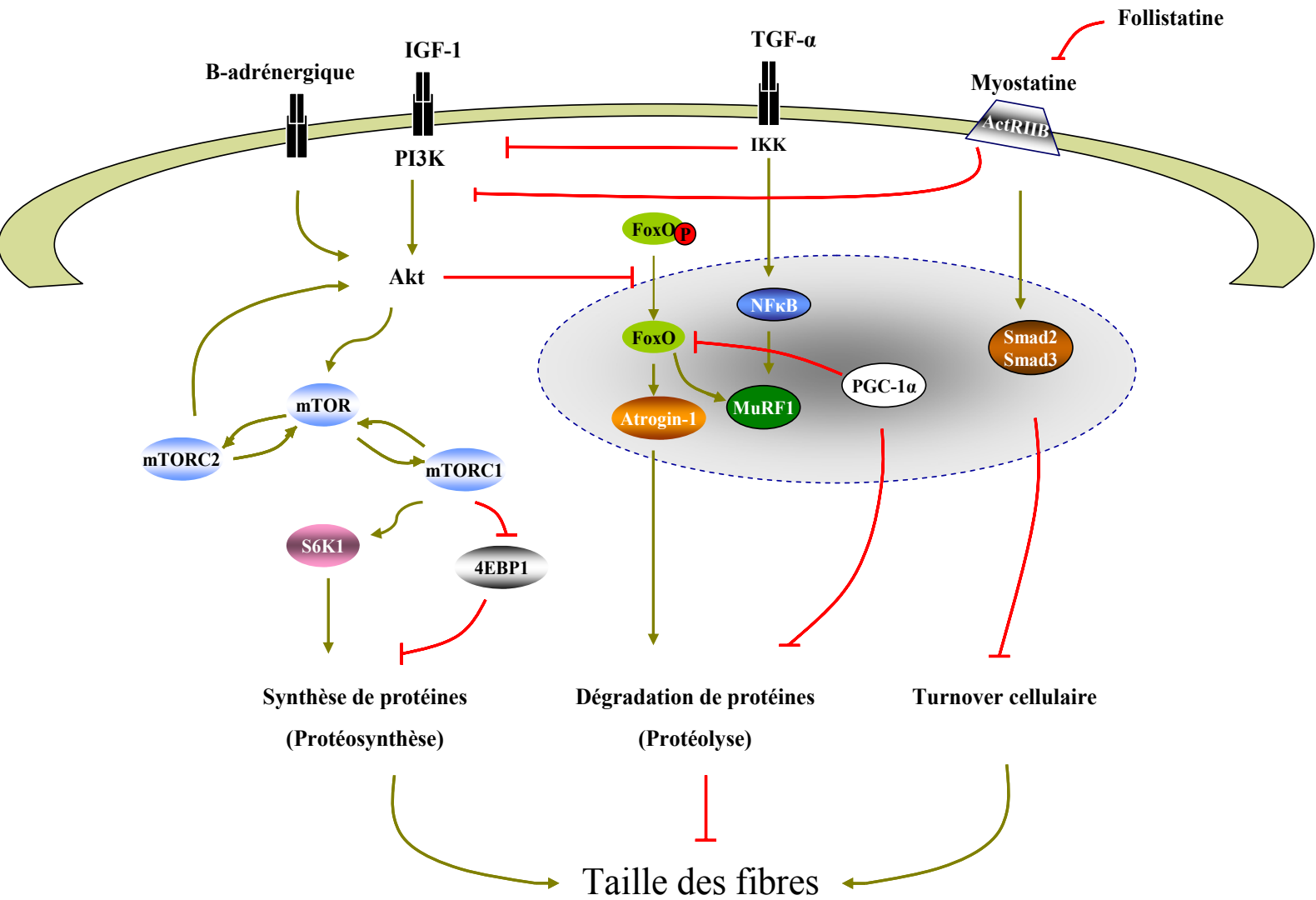
Chez l'adulte, l'expression du facteur de transcription MNF (Myocyte nuclear factor) est restreinte aux cellules satellites. Deux isoformes de MNF ont été détectés MNF- $\alpha$  dans les cellules satellites quiescentes et MNF- $\beta$  dans les cellules satellites activées suite à une dégénérescence. L'inactivation du facteur MNF chez la Souris conduit à une atrophie musculaire et à une inhibition de l'activation des cellules satellites (Garry *et al.*, 1997, Garry *et al.*, 2000).

Après une dégénérescence induite par un stress oxydatif ou une rupture, un processus de réparation des fibres endommagées est mis en jeu. Les cellules satellites jouent un rôle important dans le phénomène de régénération musculaire. Après lésion des fibres, les cellules satellites sont activées en réponse à de multiples facteurs, en particulier les facteurs de croissance sécrétés par les cellules adjacentes tels que HGF, FGF, IGF-I et IGF-II (Charge and Rudnicki, 2004). Par exemple, le FGF6 aurait un rôle prépondérant dans le muscle. D'une part, il activerait la prolifération des cellules satellites et d'autre part, il retarderait la différenciation des myotubes (Delapeyriere *et al.*, 1993).



D'autres cellules "non-satellites" pourraient contribuer au phénomène de régénération, notamment les cellules musculaires "side population" (SP) (Asakura *et al.*, 2002) ou encore les cellules mésangioblastes et les cellules souches hématopoïétiques CD133+. L'administration de ces dernières dans la circulation sanguine a un effet positif sur la régénération lors d'une dystrophie musculaire (Peault *et al.*, 2007).

*Ainsi la mise en place de générations successives de fibres au cours de la myogenèse est à l'origine de la diversité des fibres musculaires, observable dès la vie fœtale et durant la vie post-natale chez les vertébrés. La myogenèse est caractérisée par une séquence d'événements cellulaires finement régulés par une multitude de facteurs incluant les facteurs de régulation myogénique et d'autres facteurs de transcription ou de croissance spécifiques de chaque étape. Ces différents facteurs ont montré soit un effet inhibiteur, soit un effet activateur sur la détermination des cellules myogéniques, la prolifération des myoblastes et leur migration vers leur localisation finale, et leur différenciation pour former des myotubes à l'origine des fibres musculaires.*



**Figure 8:** Les différentes voies impliquées dans le contrôle de la taille des fibres. (Adaptée de Sandri, 2007).

### III. Régulation de la masse musculaire

Le maintien de la masse musculaire est sous la dépendance de différentes voies de signalisation contrôlant la balance entre les processus d'atrophie et d'hypertrophie. L'atrophie se caractérise par une diminution du diamètre des fibres et une dégradation accrue des protéines. En revanche, l'hypertrophie se caractérise par une augmentation à la fois du nombre et de la taille des fibres musculaires. Elle est associée à une synthèse protéique importante.

#### III.1. Atrophie

L'atrophie musculaire, ou perte musculaire, peut survenir lors de situations physiopathologiques comme le vieillissement, le cancer et la Dystrophie musculaire de Duchenne par exemple.

Elle est caractérisée par une diminution du diamètre des fibres et du nombre des organites cytoplasmiques comme les noyaux. Ceci a pour effet de déséquilibrer le ratio nucléocytoplasmique et donc la balance protéosynthèse/protéolyse en faveur d'une baisse de la synthèse des protéines. L'atrophie musculaire est aussi caractérisée par une diminution du nombre des myonuclei par apoptose (pour revue: (Allen *et al.*, 1999); (Ferreira *et al.*, 2008).

Lors de l'atrophie musculaire, les voies de signalisation sont dérégulées en faveur de la protéolyse (figure 8) avec pour conséquence une activation des différents systèmes enzymatiques nécessaires pour cette fonction: voie du protéasome ubiquitine-dépendante, ubiquitine-ligases MuRF1 et atrogine-1/MAFbx (Bodine *et al.*, 2001, Gomes *et al.*, 2001).

#### *Voie FoxO*

Au niveau musculaire, il existe 3 isoformes de facteurs de transcription Forkhead FoxO (Forkhead box O), FoxO1, FoxO3 et FoxO4. Cette famille de facteurs de transcription joue un rôle crucial dans la dégradation des protéines. Leur fonction est inhibée *via* leur phosphorylation par Akt. Une fois phosphorylée, les protéines FoxO sont exclues du noyau et ne peuvent plus activer l'expression d'un certain nombre de gènes cibles impliqués dans l'atrophie musculaire (encore appelés atrogènes), comme l'Atrophine-1/MAFbx et MuRF1. L'activation des protéines FoxO *via* leur déphosphorylation survient lors de l'atrophie



musculaire, alors que les voies de signalisation telle que la voie PI3K/Akt sont dérégulées (Stitt *et al.*, 2004). Des souris surexprimant FoxO3 présentent une atrophie musculaire et une surexpression du gène Atrogin-1/MAFbx (Sandri *et al.*, 2004). Ce rôle de FoxO3 est abrogé par l'expression de PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ), un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires agissant comme facteur de transcription des gènes cibles (Sandri *et al.*, 2006). FoxO1 est également impliqué dans la perte de la masse musculaire (Kamei *et al.*, 2004). En effet, les souris transgéniques surexprimant ce facteur ont une masse corporelle moins élevée que celle des souris témoins. FoxO1 serait un régulateur négatif de l'expression des gènes codant les protéines structurales dans les fibres I comme l'isoforme lent de myosine, l'isoforme lent de la troponine et celui de  $\alpha$ -tropomyosine, ce qui conduit à la détérioration du muscle squelettique (Kamei *et al.*, 2004). Dans les cellules myogéniques C2C12, l'activation de FoxO1 diminue la voie mTOR (impliquée dans le contrôle de la protéosynthèse) (figure 8) et augmente l'expression de 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein-1), un régulateur négatif de l'initiation de la traduction, entraînant par conséquent une diminution de la synthèse des protéines (Southgate *et al.*, 2007).

#### *Voie NF $\kappa$ B*

Une activation de la voie NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B) a été montrée dans plusieurs conditions physiopathologiques caractérisées par une perte de la masse musculaire. En effet, l'activation de NF $\kappa$ B chez la souris induit une protéolyse importante ubiquitine-dépendante et une sur-expression de la ligase MuRF1 mais pas de celle de MAFbx (figure 8) (Cai *et al.*, 2004). En accord avec ces données, il a été rapporté que des souris présentant un KO NF $\kappa$ B montrent une résistance à l'atrophie qui est due à l'inactivation de l'expression des atrogènes MAFbx et MuRF1 (Hunter and Kandarian, 2004). Une autre étude a montré une sur-expression de la MAFbx qui est due surtout à une activation de la p38 MAPK par le TNF $\alpha$  (Li *et al.*, 2005)

#### *Myostatine*

Le facteur de croissance myostatine (auquel sera consacré un chapitre spécifique de l'introduction bibliographique) contribue aussi à l'atrophie musculaire. Durieux *et al.* (2007) ont induit une expression ectopique du gène de la *myostatine* après électrotransfert dans le muscle *Tibialis anterior* des rats adultes. Ils ont rapporté que la surexpression de la MSTN provoque une diminution significative de la masse musculaire, de la section transversale des





fibres et du contenu en protéines musculaires. Aucune diminution du nombre des fibres n'a été constatée. La sur-expression de la *myostatine* a provoqué aussi une diminution importante de l'expression des gènes codant pour les protéines de structure du muscle (MyHCIIb, Troponine I, Desmine), et une baisse de l'expression de MyoD et de myogénine. La surexpression de la *myostatine* s'accompagne également d'une diminution significative des ARNm de la Calvéoline-3 et du PGC-1 $\alpha$ . L'induction de la *myostatine* est responsable de la réduction du nombre des myotubes et de leur taille *in vitro*, d'une baisse de la masse corporelle *in vivo* et d'une augmentation dans l'expression des gènes protéolytiques *via* des ubiquitinations (Atrogine-1, MuRF et E2). La *myostatine* inhibe la phosphorylation de Akt et induit par conséquent une augmentation du taux de FoxO1 actif. Ceci permet une activation de l'expression des gènes liées à l'atrophie (McFarlane *et al.*, 2006).

#### *Voies JNK et MAPK*

Des travaux réalisés sur le muscle *Soleus* de rats suspendus ont montré que le phénomène de l'atrophie s'accompagne d'une augmentation de l'activité des MAPKs (mitogen-activated protein kinase) comme la p38 et JNK (Jun NH2-terminal kinases) (Childs, 2003). La JNK diminue la synthèse protéique *via* une régulation négative du signal induit par l'insuline et une réduction de l'activité de Akt. Ceci favorise le développement d'une insulino-résistance lors d'une atrophie musculaire (Hilder, 2003) (Hilder, 2003).

#### *Stress oxydant*

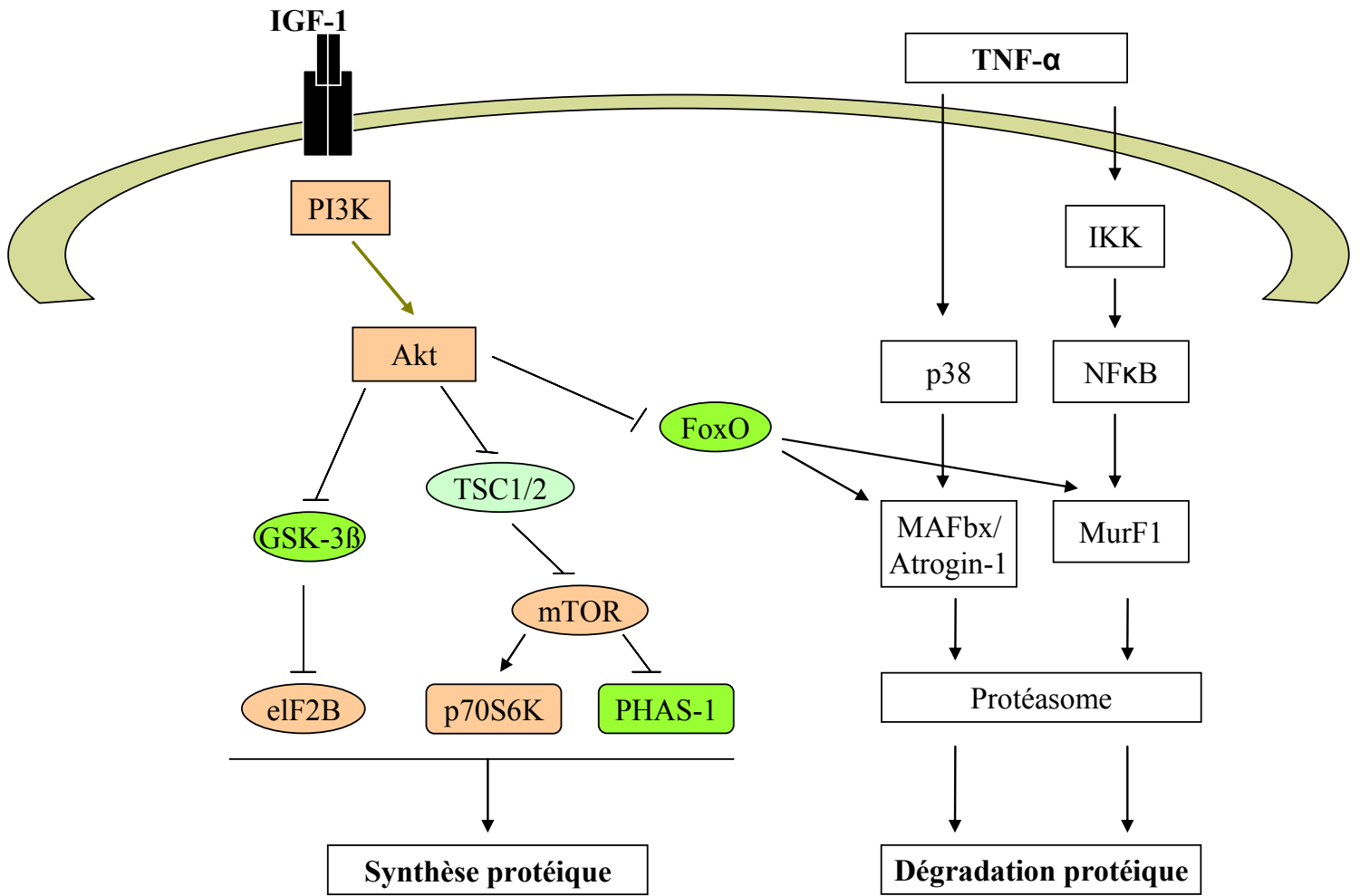
L'atrophie peut être associée aussi au stress oxydant et à la production des espèces oxygénées réactives (ROS). Il a été montré que les voies de signalisation de NF $\kappa$ B (Li *et al.*, 1999) et FoxO (Furukawa-Hibi *et al.*, 2002) peuvent être activées par des ROS. Dans ce fait, les ROS et le stress oxydant peuvent initier le déclenchement des voies de signalisation conduisant à une atrophie musculaire (Furukawa-Hibi, 2002).

### III.2. Hypertrophie

L'hypertrophie musculaire est caractérisée par une augmentation de la masse musculaire résultant d'une augmentation de la taille (hypertrophie) et/ou du nombre de fibres (hyperplasie). Plusieurs études ont montré l'implication des cellules satellites dans la croissance musculaire en favorisant à la fois la protéosynthèse et le maintien des domaines

## Hypertrophie musculaire

## Atrophie musculaire



**Figure 9:** Différentes voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'hypertrophie et de l'atrophie.

(Adaptée de Glass, 2004 ; Cai et al., 2004).

nucléo-cytoplasmiques (Quantité du cytoplasme / nombre de noyaux) (Moss and Leblond, 1971, Yan and Williams, 2006). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans le processus d'hypertrophie (figure 8) et sont responsables de l'augmentation de la synthèse des protéines et de la survie cellulaire.

#### *Voie de signalisation IGF1-AKT*

L'implication d'IGF1 dans l'hypertrophie du muscle squelettique a été montrée par de nombreuses études. Ce facteur induit une augmentation de la masse musculaire en stimulant la voie PI3K / Akt (figure 9), une voie importante pour la synthèse des protéines (Bodine *et al.*, 2001, Rommel *et al.*, 2001). Son rôle a été confirmé chez des souris transgéniques présentant une sur-expression de ce facteur dans le muscle squelettique, et une hypertrophie musculaire (Coleman, 1995, Musarò, 2001). De plus, l'expression ectopique de IGF-1 dans les muscles *Gastrocnemius* et *Soleus* de souris adultes engendre une hypertrophie musculaire (Alzghoul *et al.*, 2004).

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'hypertrophie musculaire font intervenir la voie PI3K/Akt et ses cibles en aval (mTOR, S6K, eIF2B) (figure 8). Plusieurs études ont montré le rôle majeur de Akt comme médiateur de l'hypertrophie musculaire. Ainsi, une hypertrophie des fibres musculaires peut être induite par une surexpression de la forme active de Akt (Bodine *et al.*, 2001). L'activation de Akt est suffisante pour induire une augmentation de la taille du muscle squelettique. Cette dernière se produit *via* une augmentation marquée de la taille des fibres et une activation des voies de synthèse protéique (Lai *et al.*, 2004). Une étude récente a montré que chez des souris transgéniques surexprimant une forme active de Akt1, l'hypertrophie musculaire est due à une augmentation de la taille des fibres musculaires de type IIb spécifiquement et s'accompagne d'une augmentation de la force de ces souris (Izumiya *et al.*, 2008). En revanche, des souris dont le gène Akt1 a été inactivé présentent un retard de croissance et une atrophie musculaire (Yang *et al.*, 2004).

En réponse à l'IGF-1, d'autres cibles sont activées en aval, comme c'est le cas pour la calcineurine. La calcineurine est une phosphatase serine-thréonine exprimée d'une façon ubiquitaire, et dont l'activité est dépendante du calcium. *In vitro*, la transfection du gène IGF-1 dans des cellules myogéniques active la transcription du gène de la calcineurine et favorise la localisation nucléaire de la protéine (Musaro, 1999). *In vivo*, cette protéine joue un rôle clé dans l'activation des gènes spécifiques des fibres de type lent. *In vitro*, la calcineurine a été montrée comme étant un médiateur de l'hypertrophie des cellules musculaires en réponse à l'IGF-1 (Naya *et al.*, 2000). Des travaux réalisés sur le muscle *Soleus* ont montré que, lors de



l'atrophie, l'expression de la calcineurine est augmentée. Cette augmentation représente un mécanisme compensateur dans le maintien de la masse musculaire en face d'un événement qui induit une atrophie musculaire (Dupont-Versteegden, 2002).

#### *Voie m-TOR-S6K et contrôle de la synthèse protéique*

La voie m-TOR (mammalian target of rapamycin) est une des cibles en aval de la voie PI3K/Akt. Le rôle de m-TOR dans la croissance musculaire a été démontré *in vivo* par l'observation que l'administration de rapamycine, un inhibiteur de m-TOR, bloque l'hypertrophie musculaire (Bodine *et al.*, 2001, Pallafacchina *et al.*, 2002). L'effet positif de mTOR sur la synthèse des protéines (Figure 8) est médié par l'intermédiaire d'une phosphorylation activatrice de la protéine S6K (ribosomal protein S6 kinases, protéine impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm en protéines (Ohanna *et al.*, 2005) et de l'inhibition de 4E-BP1 (Hay and Sonenberg, 2004). Welle *et al.* (2009a) ont proposé que cette voie serait une cible de la myostatine. En effet, un niveau basal d'activité de la myostatine dans le muscle adulte est suffisant pour inhiber le taux de synthèse des protéines myofibrillaires et la phosphorylation de S6K et de la protéine ribosomale S6.

Le contrôle de la synthèse protéique passe aussi par une régulation de l'activation de la protéine GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3  $\beta$ ), une autre cible en aval de la voie PI3K/Akt au carrefour des voies de prolifération, différenciation et survie cellulaire. GSK-3 $\beta$  bloque l'activation de la protéine eIF2B (eukaryotic initiation factor 2B) qui est impliquée dans la synthèse protéique. Une étude *in vitro* a montré que l'inactivation de GSK-3 $\beta$  induit une hypertrophie importante des myotubes (Rommel *et al.*, 2001).

*De nombreuses études ont contribué à la compréhension des voies de signalisation contrôlant l'hypertrophie ou à l'atrophie musculaire et à leur régulation. Il a été montré que la masse du tissu musculaire contrôlée par une balance entre l'accrétion et la dégradation protéique. Les noyaux musculaires et le territoire cytoplasmique qu'ils contrôlent sont déterminants pour assurer cette fonction.*



**Figure 10: Différentes espèces porteuses d'une mutation naturelle du gène de la myostatine**  
 A : Culard charolais (Sélection sur mutation mh)  
 B : Phénotype « Bully » chez le chien de race Whippet porteur de la mutation mh/mh  
 C : Bébé porteur d'une double mutation du gène de la myostatine

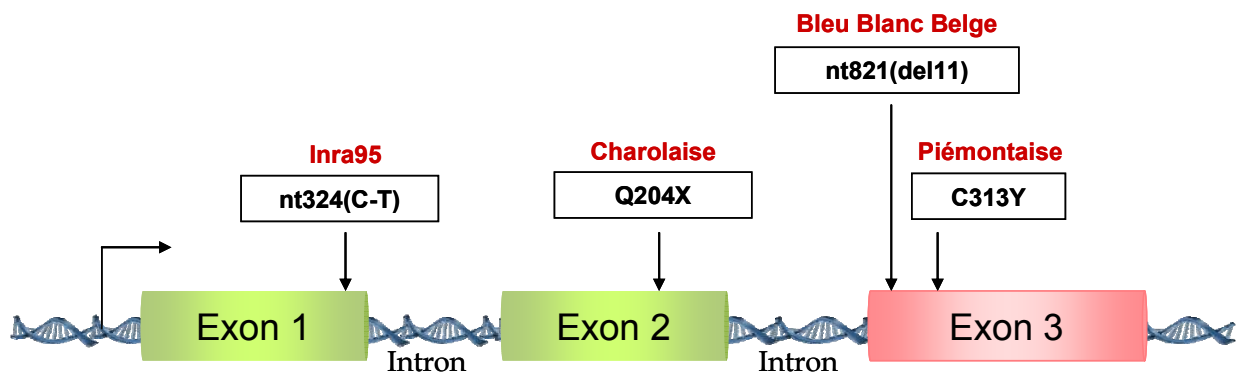
## IV. La Myostatine

### IV.1. Mutation associées à des phénotypes hypermusclés

Chez les bovins, le caractère «culard», caractérisé par une augmentation généralisée de la masse des muscles (+25%,(Menissier, 1982), est connu depuis plus de deux siècles (Culley, 1807) et a été intensivement sélectionné. Les animaux culards (Figure 10A) diffèrent aussi de leurs congénères normaux par une réduction de la taille des autres tissus et organes (-40%) en particulier de celle de leurs tissus adipeux et squelettique. Le caractère culard se traduit également par une réduction des dimensions de carcasse (longueur de carcasse, profondeur de poitrine, hauteur et largeur du bassin) (Clinquart *et al.*, 1998). L'augmentation globale de la masse musculaire est liée principalement à un nombre accru de fibres musculaires (hyperplasie). Les bovins culards ont une proportion plus élevée de viande maigre que les bovins normaux. Leur viande est pâle et tendre (King and Menissier, 1982), principalement en raison d'une proportion élevée des fibres glycolytiques rapides et de la faible teneur de leurs muscles en collagène (Bailey *et al.*, 1982, Hanset *et al.*, 1982). Elle présente une moindre saveur du fait de faibles dépôts de gras intramusculaire (Bailey *et al.*, 1982). Ces bovins présentent de plus des caractéristiques physiologiques défavorables telles qu'une fatigabilité accrue à l'effort et une grande susceptibilité aux maladies respiratoires ainsi qu'une fertilité réduite, des difficultés de vêlage nécessitant des césariennes et une mortalité importante des veaux (Bellinge *et al.*, 2005). Ces dernières contrebalancent les caractéristiques anatomiques qui rendent ces bovins économiquement rentables.

Le phénotype culard avait été initialement attribué à un gène majeur autosomal appelé *mh* (muscle hypertrophy,(Hanset and Michaux, 1985), localisé à l'extrémité centromérique du chromosome 2 bovin (Charlier *et al.*, 1995). En 1997, une équipe belge a montré, par clonage positionnel, que le gène MSTN co-localisait au locus *mh* (Grobet *et al.*, 1997). Plus précisément, elle a démontré que le caractère culard découlait de mutations induisant une perte de fonction de la myostatine. Or, le gène MSTN venait tout juste d'être identifié chez la Souris, à partir d'oligonucléotides dégénérés correspondant à des régions de séquences conservées au sein de la famille des TGF $\beta$  (McPherron *et al.*, 1997a). Son inactivation induisait également un phénotype hypermusclé fortement marqué, lié à la fois à une hyperplasie et à une hypertrophie des fibres musculaires. Une délétion dans le gène MSTN a





**Figure 11:** Structure du gène de la myostatine et position des mutations responsables de l'hypertrophie chez les bovins sur le gène de myostatine.

ensuite été identifiée chez les souris « Compact » sélectionnées pour leur masse musculaire élevée et leur haute teneur en protéines (Szabo *et al.*, 1998).

## IV.2. Caractéristiques

La famille des TGF- $\beta$  compte une trentaine de membres chez les mammifères dont 3 isoformes TGF- $\beta$ , 4 activines  $\beta$ , la protéine nodal, 10 BMPs et 11 GDFs (*Growth Differentiation Factors*). Cette famille joue un rôle vital dans le développement et dans l'homéostasie des tissus par sa régulation des différents processus biologiques: la différenciation, l'adhésion, la migration, la prolifération et la mort cellulaire (Massague, 1990, Sporn and Roberts, 1990, Roberts and Sporn, 1993). La myostatine, un membre de cette superfamille, connu sous le nom Growth differentiation factor 8 (GDF-8), est plus particulièrement impliquée dans la régulation négative de la masse musculaire (Lee and McPherron, 1999).

### IV.2.1. Le gène de la myostatine

Le gène codant pour la myostatine (MSTN) a été localisé sur le chromosome 2 chez l'Homme (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998a) et le Bovin (Grobet *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 1997) et sur les chromosomes 15 chez le Porc (Sonstegard *et al.*, 1998), 7 chez le Poulet (Sazanov *et al.*, 1999), 1 chez la Souris (Szabo *et al.*, 1998) et 9 et 22 chez le zébrafish (Xu *et al.*, 2003, Kerr *et al.*, 2005), respectivement. Des mutations « perte de fonction » ont été décrites, chez les Bovins (Grobet *et al.*, 1997, Kambadur *et al.*, 1997, McPherron and Lee, 1997, Grobet *et al.*, 1998), la Souris (Szabo *et al.*, 1998), et plus récemment chez l'Homme (Schuelke *et al.*, 2004) et le Chien (Mosher *et al.*, 2007).

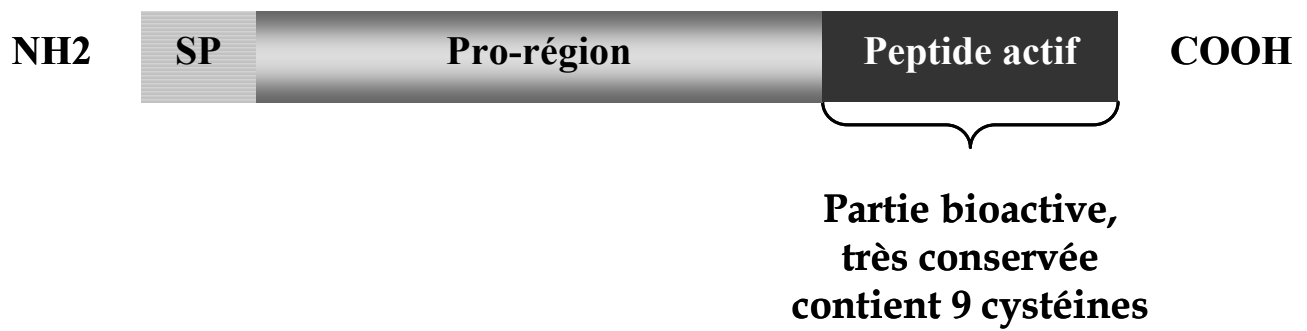
Chez la souris, la séquence codante du gène MSTN englobe environ 1128 bp (McPherron *et al.*, 1997b). Elle est composée de trois exons de longueurs de 373, 374 et 381 pb, respectivement et de deux introns (figure 11). Le promoteur du gène contient une séquence E-box qui est une cible des facteurs myogéniques et d'autres éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GREs) (Ma *et al.*, 2003), à FOXO et aux Smads (Allen and Unterman, 2007). Le gène dispose de trois sites d'initiation de la transcription. Le début de l'exon 1 code pour le peptide signal de la protéine. La fin de l'exon 1, l'exon 2 et le début de l'exon 3 codent pour le pro-domaine de la protéine. La majeure partie de l'exon 3 code pour le



domaine actif de la protéine. Le gène est transcrit en un ARNm de 3,1 kb qui est traduit en un peptide de 375 acides aminés correspondant au précurseur de la protéine de 52 kDa (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998a, Jeanplong *et al.*, 2001).

Chez les bovins, une hétérogénéité allélique a été rapportée pour les races européennes et un certain nombre de mutations indépendantes ont été observées (Georges *et al.*, 1998). Plusieurs mutations "perte-de-fonction" (figure 11) ont été identifiées dans les 3 exons de la région codante du gène (Grobet *et al.*, 1997, Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998a, Jeanplong *et al.*, 2001). Elles correspondent à : (a) des délétions telles que la délétion nt821(del11) de 11-bp des nucléotides dans l'exon 3 en race le bleu belge (Grobet *et al.*, 1997); (b) des changements d'acide aminé tels que ceux induits par la mutation de C313Y dans l'exon 3 en races de Piedmontaise et de Gasconne ou la mutation de Q204X en race Charolaise (pour revue, voir(Kambadur *et al.*, 1997), cette dernière étant fréquemment retrouvée dans la lignée synthétique INRA95 (Grobet *et al.*, 1998). La mutation Q204X consiste, par exemple, en une transversion C-T au nucléotide 610 et engendre un codon " stop" prématuré. Ces mutations ont comme conséquence la production d'une forme tronquée (ex. la race Blanc Bleu Belge) ou intégrale (ex. la race Piémontaise) inactives de la myostatine. Certains animaux présentent une forte musculature sans qu'aucune des mutations fonctionnelles connues dans le gène ne soit présente (Grobet *et al.*, 1997, Grobet *et al.*, 1998). Ainsi, les bovins de race Blonde d'Aquitaine ne présentent aucune de ces mutations en dépit de caractéristiques phénotypiques similaires à celles des culards (Listrat *et al.*, 2001). Toutefois, l'existence de mutations inhibant l'expression du gène MSTN ne peut être exclue dans cette race. On sait en effet qu'une mutation, créant un site illégitime pour des microARNs sur les ARN transcrits et entraînant par conséquence la dégradation des ARN myostatine, est responsable du phénotype hypermusclé des moutons Texel belges (Clop *et al.*, 2006).

Chez le Chien, une étude récente de Mosher *et al.* (2007), a montré qu'une mutation naturelle du gène MSTN chez des chiens de race Whippet conduit à un phénotype « Bully » Whippet (figure 10B). Ces derniers possèdent deux copies d'une mutation de deux paires de bases au niveau du 3<sup>ème</sup> exon conduisant à un codon stop prématuré au niveau de l'acide aminé n° 313. Les animaux hétérozygotes sont plus musclés que les animaux homozygotes sauvages et ils sont parmi les plus rapides dans les compétitions. Les chiens possédant les deux copies de cette mutation présentent une musculature très développée et des performances physiques et sportives supérieures aux autres chiens. Ces résultats sont les premiers qui lient quantitativement une mutation du gène MSTN à l'augmentation des performances athlétiques.



**Figure 12:** Structure de la protéine myostatine.

Chez l'Homme, une mutation a également été retrouvée dans le gène. Schuelke *et al.* (2004) ont publié le cas d'un bébé allemand dont le développement musculaire important avait attiré l'attention des médecins dès la naissance. Le bébé s'est révélé porteur d'une double mutation naturelle du gène MSTN, qui est déjà connue chez la Souris mais inédite chez l'Homme. Cette mutation correspond à une transition d'un nucléotide [de G à A] dans le premier intron du gène. Cette mutation conduit, après épissage de l'ARNm, à l'addition de 109 nucléotides codants après le premier exon, avec pour conséquence l'apparition d'un codon stop inattendu. Ce bébé montrait une augmentation importante de sa masse musculaire et ses muscles étaient deux fois plus volumineux et forts que ceux d'un enfant non porteur de la mutation (figure 10C). Il présentait également une diminution de la masse lipidique sous-cutanée.

Nishiyama *et al.* (2007) ont identifié deux nouvelles mutations non-sens dans le gène MSTN (p.95D>H et p.156L>I) chez des patients atteints d'une dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Parmi les patients, deux sont hétérozygotes pour ces mutations mais ils ne présentent pas l'augmentation du volume ou de la force de leurs muscles et aucun nucléotide modifié n'a créé de cible des  $\mu$ RNAs au niveau de la région 3'UTR.

#### IV.2.2. Structure de la protéine

Comme pour les autres membres de la famille des TGF $\beta$ , la myostatine serait synthétisée sous forme latente (Thomas *et al.*, 2000, Huet *et al.*, 2001). La protéine comporte toutes les caractéristiques des membres de la famille des TGF $\beta$  (figure 12): elle est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif comprenant une courte séquence signal amino-terminale pour la sécrétion, une pro-région représentant environ 70 % de la protéine totale non mature et une petite région carboxy-terminale, codée par l'exon 3, qui constitue la région bioactive de la protéine. Cette dernière région comprend 9 résidus de cystéines, conservés parmi les membres de la famille, favorisant la formation de la structure tertiaire à l'aide de ponts disulfures intra- et inter-chaînes, la myostatine agissant sous forme dimérique (McPherron *et al.*, 1997a, Tries *et al.*, 2001). La séquence protéique de la myostatine est très conservée parmi les espèces. Ainsi, les séquences murine, humaine, porcine et aviaire présentent 100% d'homologie dans la région carboxy-terminale (McPherron *et al.*, 1997a). La forme précurseur subit plusieurs étapes de maturation pour devenir active. Deux clivages protéolytiques permettent la libération de la forme bioactive de la protéine. Le premier a lieu dans la lumière du réticulum endoplasmique et a pour fonction l'élimination du peptide signal. Le second a lieu dans l'appareil de Golgi et permet l'élimination de la pro-région (appelé LAP pour *Latency*



*Associated Peptide*, pour le TGF $\beta$ ) et donc la libération d'un dimère carboxy-terminal bioactif. Ce clivage est réalisé au niveau d'une séquence consensus Arg-Ser-Arg-Arg (RSRR en positions 263 à 267) probablement par des protéases de la famille des subtilisines telles que la Furine. Suite à ces clivages, le dimère C-terminal et le propeptide restent liés de façon non covalente et forment un complexe latent. Une dégradation protéolytique du propeptide libère finalement le peptide bioactif. Elle fait intervenir des métalloprotéases (Huet *et al.*, 2001, Wolfman *et al.*, 2003, Lee, 2008). Différents poids moléculaires ont été rapportés dans la bibliographie (McPherron *et al.*, 1997a, Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998a, Sharma *et al.*, 1999, Wehling *et al.*, 2000, Taylor *et al.*, 2001) vraisemblablement en raison de l'existence de modifications post-traductionnelles (dont des glycosylations) dans les modèles cellulaires utilisés pour la production du peptide. Chez la souris par exemple, on retrouve un précurseur de la protéine entière de 52 kDa, un propeptide 26 kDa et un peptide 12,5 kDa (McMahon *et al.*, 2003).

#### IV.3. Expression

Contrairement à la majorité des gènes codant pour les membres de la famille des TGF $\beta$ , l'expression de la MSTN n'est pas ubiquitaire, mais principalement restreinte au muscle squelettique (McPherron *et al.*, 1997a, Ji *et al.*, 1998, Sharma *et al.*, 1999). Cependant, des transcrits ont également été détectés, bien qu'en plus faible quantité, dans le tissu adipeux de Souris (McPherron *et al.*, 1997a), la glande mammaire de truies en lactation (Ji *et al.*, 1998) et le cœur de Souris et de Mouton (Sharma *et al.*, 1999) où seule la forme non mature de la protéine est détectée, et le tissu adipeux (McPherron *et al.*, 1997a). Chez les Poissons, les transcrits MSTN1a, MSTN1b et MSNT2a sont détectés dans de très nombreux tissus (Rescan *et al.*, 2001, Garikipati *et al.*, 2007).

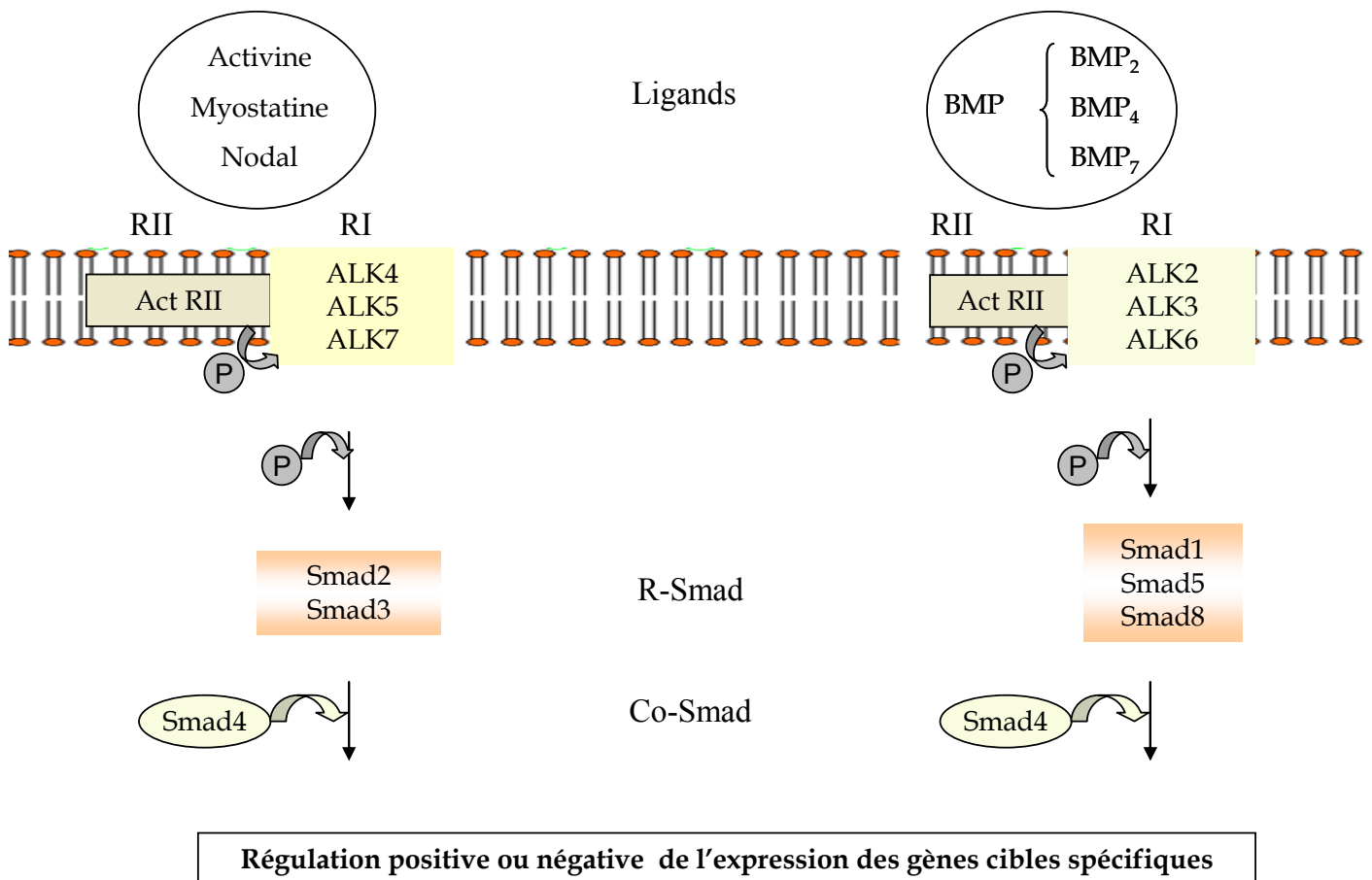
Des expériences d'hybridation *in situ*, ont permis de localiser l'expression du gène dans les faisceaux de fibres plutôt que dans le tissu conjonctif (Ji *et al.*, 1998, Deveaux *et al.*, 2003). Chez le fœtus Bovin, les ARN messagers sont détectés dans des cellules myogéniques caractérisées par l'expression des isoformes MyHC (Deveaux *et al.*, 2003). Cependant, seules les cellules les plus en retard dans leur différenciation contractile renferment ces transcrits. En fin de vie fœtale, l'expression est restreinte aux fibres de type IIA (Deveaux *et al.*, 2003). Ceci suggère donc que l'expression est limitée à un faible pourcentage de cellules, expliquant les difficultés rencontrées par différents auteurs pour la mettre en évidence. Chez le Porc (Ji *et*





*al.*, 1998) et les rongeurs, l'expression de *myostatine* est plus élevée dans les muscles rapides que dans les muscles lents (Carlson *et al.*, 1999, Wehling *et al.*, 2000) avec une corrélation positive entre les fibres exprimant les isoformes de MyHC de type IIB et le niveau d'expression de MSTN (Carlson *et al.*, 1999, Salerno *et al.*, 2004). Chez les Poissons, l'expression de la MSTN1b est plus importante dans le muscle rouge que dans le muscle blanc (Rescan *et al.*, 2001). Ainsi le gène MSTN présente une expression différente selon les espèces, le type de muscle et l'âge de l'animal. De plus, des études suggèrent une distribution différente des transcrits et de la protéine (Mendler *et al.*, 2000, Sakuma *et al.*, 2000) et il existe des données contradictoires concernant l'abondance de la protéine selon le type de fibres (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998b, Wehling *et al.*, 2000). Ces différents résultats peuvent être attribués, au moins en partie, aux anticorps utilisés qui pourraient reconnaître d'autres membres de la famille des TGF $\beta$ , en particulier GDF11, dont le domaine carboxy-terminal présente 90 % d'homologie avec celui de la myostatine (McPherron *et al.*, 1997a).

Le gène MSTN est exprimé très tôt au cours de la gestation. Ainsi, chez la Souris, les transcrits sont détectés dès 9,5 jours *pc* dans les somites, puis dans les muscles au cours de la gestation et restent détectables, bien que plus faiblement, jusqu'aux stades adultes (McPherron *et al.*, 1997a). Chez le Bovin, l'expression est détectée très faiblement à partir de 16 jours *pc*, puis augmente à partir de 30 jours *pc* (Kambadur *et al.*, 1997) au moment de la mise en place de la première génération de cellules musculaires (Picard *et al.*, 2002). L'expression présente un pic à 90-110 jours *pc* et se maintient ensuite à un niveau peu élevé au cours du dernier tiers de gestation (Oldham *et al.*, 2001, Deveaux *et al.*, 2003), caractérisé par une importante phase de différenciation contractile et métabolique. Des différences dans le profil d'expression temporel de MSTN ont été observées entre différents muscles (*Semitendinosus*, *Biceps femoris* et *Masseter*). Elles ont été mises en relation avec les différences de précocité de mise en place de ces muscles (Deveaux *et al.*, 2003). Après la naissance, l'expression chute à un niveau très faible (Jeanplong *et al.*, 2001). En parallèle, une réduction de l'abondance de la myostatine mature a été rapportée dans les muscles pendant les phases de croissance linéaire chez la Souris. Cependant, des différences ont été observées entre les muscles des mâles et ceux des femelles, l'abondance des transcrits étant plus élevée et celle de la protéine mature étant plus faible chez les mâles (Oldham *et al.*, 2009). L'expression du gène est donc régulée au cours de la myogenèse chez le Bovin (Oldham *et al.*, 2001, Deveaux *et al.*, 2003, Shibata *et al.*, 2006) et chez d'autres espèces telles que le Porc (Ji *et al.*, 1998) ou le Poulet (Kocamis *et al.*, 1999). Dans tous les cas, elle semble chuter avec la différenciation myogénique. L'expression régulée au cours de la progression de la myogenèse est cohérente avec la



**Figure 13:** Récepteurs et protéines Smad impliqués dans la voie de signalisation induite par la famille des TGFβ.

Certains membres de la superfamille (TGFβ, Activine, BMP7) initient leur action par liaison directe avec le récepteur de type II (RII), ce qui conduit au recrutement du récepteur de type I (RI) approprié. BMP2, BMP4 et dpp (decapentaplegic) constituent une exception en se fixant tout d'abord sur RI. La liaison avec une grande affinité nécessite alors le recrutement de RII.

présence de séquences consensus pour des éléments de contrôle tels que des boîtes E (site de fixation des facteurs myogéniques), des séquences de fixation du complexe AP-1 ou de MEF-2 (Ferrell *et al.*, 1999, Jeanplong *et al.*, 2001). *In vitro*, le gène MSTN n'est pas, ou très faiblement, exprimé pendant la prolifération (Mendler *et al.*, 2000, Ríos *et al.*, 2001, Kocamis and Killefer, 2002, Deveaux *et al.*, 2003). Son expression augmente dans la lignée C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> lorsque la différenciation est induite, et atteint un pic trois à quatre jours après induction, au moment de la fusion des myoblastes (Mendler *et al.*, 2000, Kocamis and Killefer, 2002). En culture primaire de myoblastes fœtaux et de cellules satellites, le pic d'expression est observé au début de la fusion (Kocamis and Killefer, 2002, Deveaux *et al.*, 2003), puis l'abondance des transcrits chute avec la différenciation. A ce stade l'expression n'est jamais localisée dans les myotubes matures (Deveaux *et al.*, 2003). Ceci est cohérent avec les observations *in vivo* montrant une chute de l'expression pendant la différenciation terminale. Ainsi, l'expression de MSTN est transitoire *in vitro*. Le phénomène de fusion ne serait pas un préalable indispensable à son expression puisqu'elle survient en l'absence de différenciation morphologique dans les cellules musculaires de la lignée murine BC<sub>3</sub>H1 (Mendler *et al.*, 2000). En revanche, dans les cellules myogéniques bovines, l'inhibition de la différenciation par la 5-bromo-désoxyuridine empêche la chute de l'expression au cours de la différenciation (Deveaux *et al.*, 2003), ce qui indique que la diminution de l'expression est consécutive à l'entrée en différenciation.

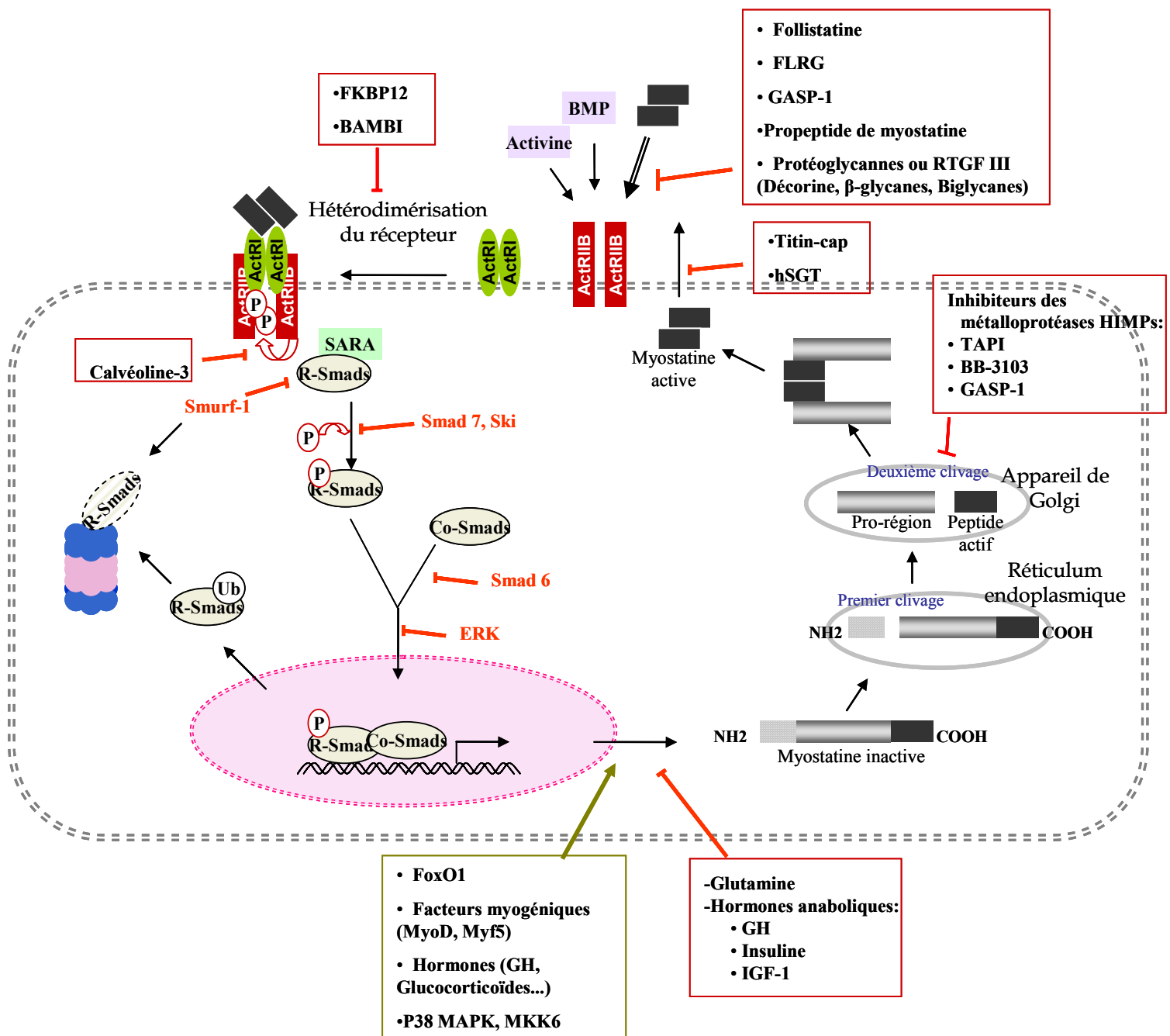
#### IV.4. Activité biologique

##### IV.4.1. Mécanismes d'action

###### IV.4.1.1. Récepteurs et transduction cellulaire

Comme les membres de la superfamille de TGF- $\beta$ , la myostatine exerce son action par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire hétérodimérique constitué de deux homodimères RI et deux homodimères RII.

Le récepteur du TGF $\beta$  est un récepteur serine/thréonine kinase, il est formé d'un récepteur de type I (RI) encore appelé ALK (Activin-like kinase) et d'un récepteur de type II (RII). Il existe plusieurs type de récepteur ALK, recrutés en fonction du type ligand fixé par RII (figure 13) et ils conditionnent par la suite le groupe des protéines Smads à activer (Shi and



**Figure 14:** Régulation de la transcription du gène, de l'activité de la protéine et du récepteur de la myostatine

Massagué, 2003). La transduction du signal jusqu'au noyau passe d'abord par la phosphorylation du RI par le RII suivie d'une cascade de phosphorylation par l'intermédiaire des R-Smads (Receptor-regulated Smad) (figure 13). Les protéines Smads présentent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au récepteur (Zimmerman and Padgett, 2000). Les R-Smads comprennent les protéines Smad2 et Smad3 (recrutées dans la voie d'activation des TGF $\beta$  et de l'activine) et Smad1, 5 et 8 qui interviennent dans la voie d'activation des BMP (Whitman, 1998). La phosphorylation des R-Smads est activée par des co-Smads (co-mediator Smad) dont la Smad4 et inhibée les I-Smads (Inhibitory Smad) comme la Smad6 qui inhibe en priorité la voie des BMP ou la Smad7 qui inhibe préférentiellement la voie des TGF $\beta$  et de l'activine.

La myostatine active (c'est-à-dire le domaine C terminal bioactif) peut se fixer sur ActRIIB et ActRIIA, mais avec une plus faible affinité pour ce dernier (Lee and McPherron, 2001). Cette liaison entraîne le recrutement du récepteur de type I appelé ALK4 ou ALK5, sa phosphorylation et son activation. La myostatine peut entrer en compétition avec d'autres molécules comme le BMP7, dont elle empêche la fixation sur le récepteur ActRIIB et exercer ainsi une action antagoniste de ce facteur (Rebbapragada *et al.*, 2003). Des souris transgéniques possédant une forme dominante négative du récepteur ActRIIB (mutation du domaine kinase) ont une augmentation spectaculaire de la masse musculaire comparable à celle observée chez les souris KO MSTN (Lee and McPherron, 2001). L'augmentation de la masse musculaire dans ces souris est le résultat d'une hypertrophie et d'une hyperplasie comme dans le cas de souris KO MSTN.

#### IV.4.1.2. Régulation de l'activité de la myostatine

L'activité de la myostatine est régulée de façon complexe à plusieurs niveaux. Il s'agit soit d'une régulation négative ou soit positive faisant intervenir des molécules inhibitrices ou activatrices. Ceci s'exerce soit au niveau de la transcription du gène, soit au niveau de l'activité de la protéine elle-même ou de l'activité de son récepteur (figure 14).

##### *Au niveau de la transcription du gène*

Le gène de la MSTN comporte 7 E-box dans sa séquence promotrice de 2.5 kb. La E-box 5 joue un rôle important dans la régulation de l'activité de ce promoteur. Les deux facteurs myogéniques MyoD et Myf5 peuvent se fixer sur le site E-box 5 et induire ainsi l'activation



du promoteur. MyoD se lie sous forme d'un homodimère sur le promoteur tandis que Myf5 se fixe sous la forme d'un hétérodimère avec la protéine ubiquitaire E47. MyoD présente l'affinité de liaison la plus élevée pour le promoteur par rapport à Myf5 (Salerno *et al.*, 2004). Une étude *in vitro* sur les myoblastes C2C12 a montré que l'expression des marqueurs de différenciation musculaires (MyoD, Myf5, Myogénine, MyHC) est inhibée suite à une administration croissante de myostatine recombinante conduisant ainsi à l'inhibition de la différenciation myogénique (Langley *et al.*, 2002). Ceci suggère l'existence d'un feed-back négatif entre la myostatine et les facteurs de transcription myogéniques.

La transcription de la *myostatine* exige la participation des régulateurs R-Smads (Smads 2 et Smad 3) et les Co-Smads (Smad 4). En revanche, elle est inhibée par Smad7 (I-Smad). L'action de Smad7 est potentialisée par une co-expression de Smurf1 (Smad Ubiquitination Regulatory Facteur-1). L'expression de la Smad7 est stimulée par la myostatine par l'intermédiaire d'interactions entre les protéines Smad2, Smad3, Smad4 et le SBE (Smad Binding Element) au niveau du promoteur de Smad7. Ces résultats suggèrent que la voie de transduction de myostatine serait régulée par Smad7 par un mécanisme de feed-back négatif (Zhu *et al.*, 2004).

L'activation de la transcription de la MSTN pourrait être régulée par de nombreux facteurs comme la p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) et son activateur MKK6, ces derniers induisant notamment l'activation de la cycline kinase inhibiteur p21 *via* l'activation de la transcription de la MSTN (Philip *et al.*, 2005). Les glucocorticoïdes induisent l'augmentation de l'expression de la MSTN ce qui contribue notamment à l'induction de l'atrophie du muscle squelettique *in vivo* et *in vitro* (Artaza *et al.*, 2002, Ma *et al.*, 2003), des fibres musculaires rapides type II en particulier (Schakman *et al.*, 2008). L'apport en glutamine, un acide aminé essentiel, inhibe l'effet des glucocorticoïdes empêchant ainsi l'expression et limitant l'abondance de la myostatine, et par conséquent l'atrophie musculaire (Salehian *et al.*, 2006). D'autres hormones anaboliques comme l'insuline, l'hormone de croissance (GH), l'IGF-1 et la testostérone pourraient inhiber la transcription de la *myostatine* et réguler positivement la masse musculaire, stimuler la synthèse des protéines musculaires et inhiber la protéolyse. Chez les personnes âgées, les déficits liés à l'âge en GH et en testostérone pourraient induire une augmentation de l'expression de MSTN. Ceci pourrait contribuer à une sarcopénie relative à l'âge (Taylor *et al.*, 2001). En effet, l'hormone anabolique GH inhibe l'expression de la MSTN dans les cellules musculaires *in vitro* et *in vivo*. Cet effet est associé à une augmentation de la masse corporelle maigre et des performances aérobiques favorables *in vivo* (Liu *et al.*, 2003). Ces données sont confirmées





par une étude récente de Oldham *et al.* (2009) qui montre que la GH diminue l'abondance de la forme mature de la myostatine et des transcrits MSTN dans le muscle *Gastrocnemius* de souris mâles en comparaison de souris femelles. Ceci suggère, donc, qu'une diminution de la myostatine pourrait contribuer au dimorphisme sexuel de la croissance du muscle squelettique.

La MSTN possède également au niveau de son promoteur un site de liaison pour FoxO1. Ce facteur de transcription contribue donc au contrôle de l'expression de la myostatine en activant son promoteur (Allen and Unterman, 2007).

#### *Au niveau de la protéine*

*Activation de la myostatine.* L'hypertrophie des cellules C2C12 pourrait être induite par l'action des inhibiteurs des métalloprotéases qui sont impliquées dans la maturation de la protéine myostatine (Huet *et al.*, 2001). Ces inhibiteurs des métalloprotéases sont appelés HIMPs (Hydroxamate-based Inhibitors of Metalloproteases) comme TAPI (Tumor necrosis factor- $\alpha$  processing Inhibiteur) et BB-3103. Ils augmentent la fusion des myoblastes C2C12 et induisent une hypertrophie des myotubes. La maturation protéolytique de la myostatine est inhibée dans les cellules C2C12 traitées par HIMP (figure 14). Les métalloprotéases sont impliquées dans la régulation de la croissance du muscle squelettique et dans la différenciation des myoblastes. La maturation protéolytique de la myostatine dans les cellules C2C12 peut être liée directement ou indirectement à l'activité des métalloprotéases sensibles à HIMP (Huet *et al.*, 2001). L'activité biologique de la myostatine peut aussi être régulée par la FLRG (Follistatine Related Gene) ou par la GASP-1 (GDF Associated Serum Protein-1) (Hill *et al.*, 2003). La FLRG, identifié comme un homologue structural de la follistatine, elle est capable de lier directement à la forme active de la MSTN et l'inhiber. En revanche, GASP-1 possède un domaine follistatine qui inhibe l'activité biologique de la myostatine mature et elle interagit aussi avec le propeptide de la myostatine alors que la régulation de ce dernier n'est pas encore élucidée (Lee, 2004). GASP-1 possède aussi plusieurs domaines de liaisons des inhibiteurs de protéases, ce qui lui confère un rôle dans l'inhibition des métalloprotéases empêchant ainsi l'activation protéolytique de la myostatine.

*Sécrétion de la myostatine biologiquement active.* L'activité de la myostatine peut être régulée *via* sa séquestration par des protéines présentes dans la cellule. La myostatine mature présente une grande affinité pour une protéine sarcomérique, la Titin-cap (T-cap). Quand la T-cap est



surexprimée dans les myoblastes C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, le taux de la prolifération cellulaire est significativement élevé bien que l'expression de la MSTN ne soit pas modifiée. Le mécanisme mis en jeu fait intervenir une séquestration de la myostatine mature par la T-cap empêchant sa sécrétion et donc son action (Nicholas *et al.*, 2002). La myostatine peut aussi lier une autre protéine appelée hSGT (human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein), protéine exprimée de façon ubiquitaire, par l'intermédiaire de sa région N terminale (Wang *et al.*, 2003). Ceci aurait pour conséquence de séquestrer la myostatine et d'empêcher sa sécrétion (Wang *et al.*, 2003).

#### *Au niveau du récepteur*

*Liaison du ligand myostatine au récepteur.* Comme nous l'avons vu précédemment la myostatine se lie au récepteur type II de l'activine (Act RIIB) et au récepteur Act RIIA mais avec une faible affinité. Dans certains cas, la liaison de la myostatine à l'ActRIIB peut être inhibée par la présence d'autres molécules, notamment, la follistatine (figure 14). Cette protéine piègerait la myostatine avec pour conséquence une inhibition de son activité favorisant ainsi la croissance de la masse musculaire (Amthor *et al.*, 2003). De plus, la follistatine pourrait interagir directement avec la MSTN dans le sérum avec une grande affinité (Zimmers *et al.*, 2002). Les protéoglycanes, comme la Décorine, le Biglycane et les  $\beta$ -glycanes sont impliqués aussi dans la régulation de l'activité de la myostatine. Présents dans la matrice extracellulaire, ils montrent une grande affinité pour les récepteurs des TGF- $\beta$  et modifient ainsi la biodisponibilité des TGF- $\beta$ . De même, la protéine Décorine pourrait piéger la myostatine dans la matrice extracellulaire et empêcher ainsi sa liaison au récepteur (Miura *et al.*, 2006).

*Activation du récepteur.* Le récepteur de la myostatine pourrait aussi être la cible de certaines molécules, comme FKBP12 (12-kDa FK506-binding protein) et de BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) (figure 14). La FKBP12 est une immunophiline qui lie le récepteur I de TGF- $\beta$  et bloque sa phosphorylation activatrice par RII. FKBP12 n'empêche pas l'association de RI avec RII mais inhibe son autophosphorylation par RII. BAMBI est une glycoprotéine transmembranaire qui agit comme un compétiteur de RI pour la liaison au RII, empêchant ainsi la formation d'un récepteur hétérodimérique (Zimmerman and Padgett, 2000). La Calvéoline-3 pourrait aussi réguler l'activation du récepteur de la myostatine. Cette isoforme spécifiquement musculaire appartenant à la famille des cavéolines (composant des



cavéoles, petites invaginations de la membrane plasmique) supprime l'activation du récepteur RI et l'hypophosphorylation de l'effecteur intra-cellulaire Smad2 jouant ainsi un rôle protecteur de l'atrophie (Ohsawa, 2006).

*Activation des Smads.* Comme nous l'avons vu précédemment, la transduction du signal des récepteurs transmembranaires des TGF $\beta$  jusqu'au noyau est réalisée par les protéines Smads. L'activité de ces protéines peut être régulée à différents niveaux : 1) l'**accès au récepteur**, où la protéine SARA (Smad Anchor for Recepteur Activation) intervient pour faciliter l'accès des R-Smads (Smad 2 et Smad 3) au récepteur, 2) la **phosphorylation des R-Smads**, inhibée par un I-Smad (cas de Smad 7) et aussi par la kinase ERK (Extra-Cellular Regulated Kinase) qui empêche la translocation du complexe Smad actif au noyau. Une autre protéine, c-Ski, interagit avec Smad 2 et Smad 3. Cette interaction a pour conséquence de bloquer leur phosphorylation qui, normalement, devrait être réalisée suite à l'activation de R-TGF- $\beta$ I (Luo *et al.*, 1999, He *et al.*, 2003). C-Ski empêche la formation de complexes entre Smad 4 et Smad 2/3, ou agit directement en régulant l'expression des protéines du complexe (Luo, 2004, Yuzawa *et al.*, 2009). 3) la **stabilité des R-Smads**, par l'intervention d'une ligase Smurf-1 (Smad Ubiquitination Regulatory Factor-1), qui ubiquitinyne les R-Smads ce qui favorise leur dégradation par le protéasome.

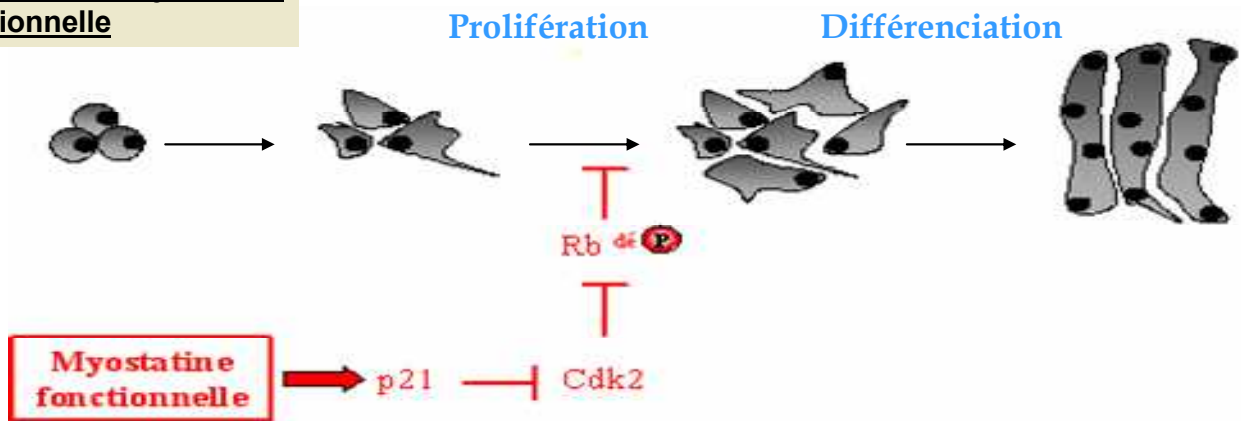
#### IV.4.2. Effets biologiques

Le rôle essentiel de la myostatine dans le contrôle de la masse musculaire a été largement décrit chez de nombreuses espèces ainsi que certains mécanismes associés. Une fois fixée sur son récepteur, la myostatine induit une cascade de signaux responsables de l'inhibition de la prolifération et de la différenciation des cellules musculaires (Thomas *et al.*, 2000, Joulia *et al.*, 2003). Myogénine et p21CKI, impliqués respectivement dans la régulation de la différenciation et la prolifération, ont été identifiés comme les principales cibles physiologiques de la myostatine endogène dans les cellules murines (Joulia *et al.*, 2003).

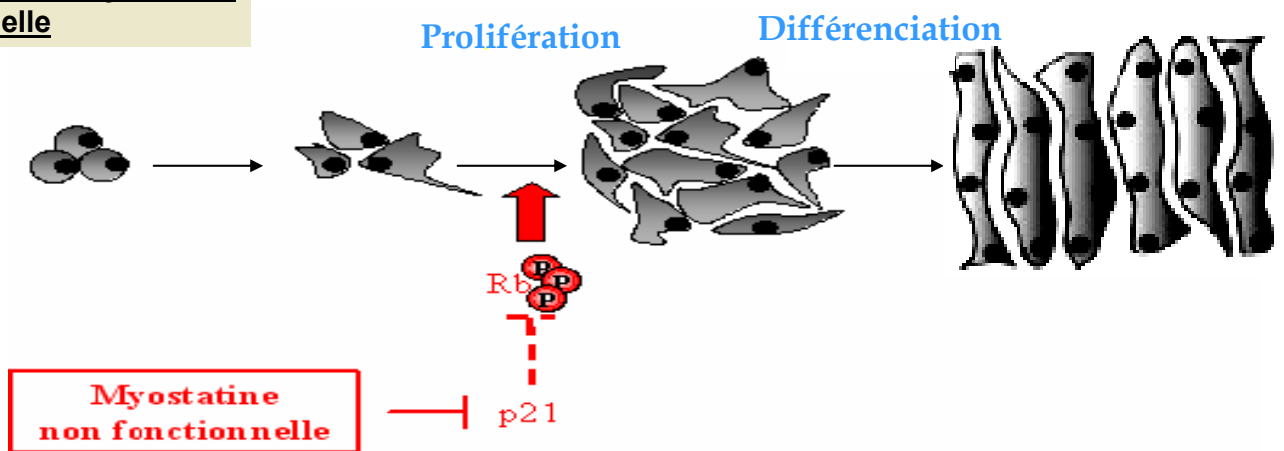
##### IV.4.2.1. Régulation de la prolifération (hyperplasie des fibres).

Le mécanisme par lequel la myostatine contrôle l'augmentation du nombre de fibres a été décrit par Thomas *et al.* (2000). La myostatine induit l'inhibition de la prolifération des myoblastes C2C12 en empêchant la progression du cycle cellulaire et l'arrêt des myoblastes

**Présence de myostatine fonctionnelle**



**Absence de myostatine fonctionnelle**



**Figure 15:** Implication de la myostatine dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules myogéniques. (D'après Thomas *et al.* 2000; Langley *et al.*, 2004).

en phase G1 du cycle. Cette inhibition est médiée par une augmentation de l'abondance de p21, un inhibiteur des cyclines kinase-dépendante (CKI), et une diminution de l'expression et de l'activité des cdk2 (cyclines kinase-dépendante 2) dans les myoblastes ainsi que de son partenaire la cycline-E. Ceci s'accompagne d'une accumulation des protéines Rb (Retinoblastoma protein), substrats majeurs des cdks, jouant un rôle dans la transcription des gènes spécifiques de la phase S sous leur forme hypophosphorylée (figure 15) (Thomas *et al.*, 2000, Langley *et al.*, 2004). D'autres cyclines sont aussi cibles de la myostatine. En effet, la sur-expression de la MSTN dans les cellules C2C12 induit une activation de GSK-3 $\beta$  et la dégradation de la cycline D1, la dégradation de cette dernière étant bloquée par l'ajout d'un inhibiteur du protéasome (Yang *et al.*, 2007). De plus, il a été suggéré que GSK-3 $\beta$  phosphorylait la cycline D1 au niveau de l'acide aminé thréonine 286, ce qui déclencherait son ubiquitinylation, et sa dégradation ultérieure par le protéasome (Diehl *et al.*, 1998). De plus, la myostatine bloque la p300, un co-activateur nécessaire à la transcription du gène codant la cycline D1 (Ji *et al.*, 2008). Cet effet de la myostatine sur la dégradation de la cycline D1 est contre-balançé par l'addition du facteur de croissance IGF-1.

Inversement, en absence de myostatine fonctionnelle, pRb se trouve dans un état phosphorylé, et les myoblastes continuent de proliférer (Thomas *et al.*, 2000, Joulia *et al.*, 2003).

D'autres protéines sont impliquées dans l'action anti-proliférative de la myostatine et activent la cycline kinase inhibiteur p21. C'est le cas de la p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) et son activateur MKK6 (Philip *et al.*, 2005) ou encore MKK4 qui sont impliqués dans la voie JNK (c-jun N-terminal kinase) (Huang *et al.*, 2007).

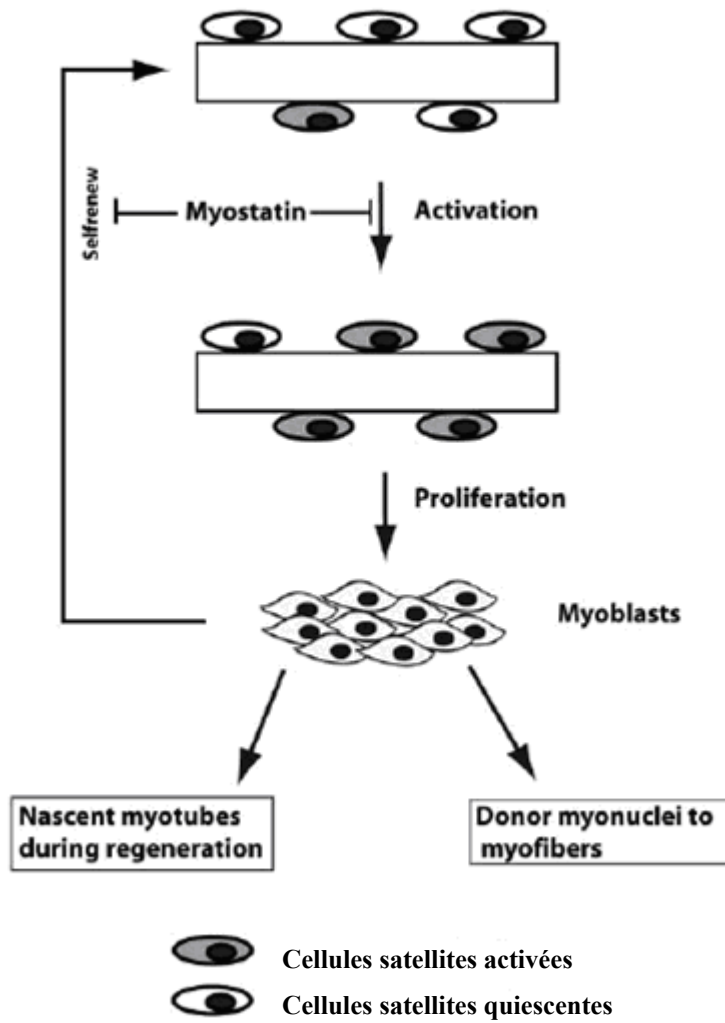
Ce contrôle de la prolifération des myoblastes par la myostatine s'accompagne par un effet négatif à la fois sur la synthèse d'ADN et des protéines (Taylor *et al.*, 2001).

#### IV.4.2.2. Régulation de la différenciation

La myostatine régule également la différenciation des myoblastes (figure 15) en inhibant l'expression des facteurs de transcription myogéniques tels que Pax-3, MyoD et Myf-5, (Ríos *et al.*, 2002, Amthor *et al.*, 2003, Guttridge, 2004, Joulia-Ekaza and Cabello, 2006).

Dans les myoblastes C2C12, la sur-expression de la MSTN entraîne une diminution de l'expression des gènes codants pour les protéines de structure du muscle (MyHC Iib, Troponine I, Desmine), et aussi une baisse de l'expression des facteurs de transcription myogéniques (MyoD, Myf5 et la myogénine) (Langley *et al.*, 2002, Durieux *et al.*, 2007). Il a été rapporté que la surexpression ou l'addition de la myostatine aux cellules C2C12 induisait





**Figure 16:** Implication de la myostatine dans la régulation de la croissance musculaire. (D'après McCroskey *et al.*, 2003).

une diminution de l'expression de MyoD et de myogénine *via* l'activation de ERK1/2 (Yang *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2007).

Chez le Bovin, un effet négatif de la myostatine sur la différenciation des myoblastes bovins a été aussi montré *in vitro* (Deveaux *et al.*, 2003).

A leur tour, les facteurs myogéniques tels que MyoD et Myf5 induisent l'activation du promoteur de MSTN, ce qui montre l'existence d'un feed back négatif entre les facteurs myogéniques et la myostatine (Salerno *et al.*, 2004).

#### IV.4.2.3. *Activation des cellules satellites*

Pendant la vie postnatale, la myostatine est impliquée dans le maintien de la masse musculaire et elle aurait un rôle négatif sur l'activation des cellules satellites et leur renouvellement chez la souris (figure 16) (McCroskery *et al.*, 2003). Cette action passe par l'inhibition de Pax7, un facteur de transcription essentiel pour l'autorenouvellement et le maintien de la population des cellules satellites. Chez le poulet, une étude plus récente de McFarland *et al.* (2007) a rapporté aussi un effet négatif de la myostatine sur la prolifération et sur la différenciation des cellules satellites dans deux types de muscles le *Pectoralis Major* et le *Biceps Femoris*.

Une augmentation du nombre total des cellules satellites a été observée dans les myoblastes adultes présentant une inactivation de MSTN (McCroskery *et al.*, 2003). Ceci est confirmé par Wagner *et al.* (2005) qui ont montré une augmentation de la masse musculaire après la régénération musculaire chez des souris âgées KO MSTN.

#### IV.4.2.4. *Rôle dans l'adipogenèse et l'ostéogenèse*

Comme suggéré par les différences observées chez les Bovins et chez les Souris porteurs de mutations, la myostatine serait également impliquée dans le contrôle de la composition corporelle, en régulant potentiellement l'adipogenèse et l'ostéogenèse. En effet, une diminution de la masse grasse est observée chez les bovins culards (Wegner *et al.*, 2000) et chez les souris présentant une inactivation du gène MSTN (Lin *et al.*, 2002, McPherron and Lee, 2002) tandis que la masse totale de dépôts adipeux est augmentée chez des souris transgéniques surexprimant le gène (Reisz-Porszasz *et al.*, 2003). Dans cette hypothèse, l'influence de la myostatine pourrait s'exercer très tôt au cours du développement, en contrôlant la différenciation des cellules précurseurs des cellules musculaires, adipogéniques, ostéogéniques et chondrogéniques, les cellules mésenchymateuses (Artaza *et al.*, 2005). En



effet, l'administration de myostatine recombinante à des cellules mésenchymateuses C3H 10T(1/2) inhibe l'expression de marqueurs de la myogenèse (MyoD, Myogénine) et stimule l'expression de marqueurs de l'adipogenèse (C/EBP $\alpha$ , Adiponectine). Ainsi, la myostatine serait capable d'orienter les précurseurs dans la voie de la différenciation adipogénique. Toutefois, des effets contradictoires ont été rapportés sur les cellules pré-adipocytaires 3T3L1 dont elle inhibe la différenciation (Kim *et al.*, 2001) de même que sur des cellules 3T3L1 et C3H 10T(1/2) dont l'adipogenèse a été induite par le facteur adipogénique BMP-7 (Rebbapragada *et al.*, 2003). Shibata *et al.* (2006) ont proposé que la myostatine pourrait contribuer à la mise en place du persillage de la viande pendant la phase d'engraissement des bovins en stimulant l'adipogenèse. Il reste toutefois à déterminer si la myostatine régule directement la masse adipeuse. Une possibilité est que les effets de la myostatine sur la masse adipeuse découlent d'un effet indirect de l'absence de myostatine dans le muscle. Cette hypothèse est confortée par les résultats récents de l'équipe de McPherron (2002) montrant que les changements du métabolisme adipeux chez les souris MSTN $^{-/-}$  résulte d'une altération du muscle squelettique plutôt que d'un effet direct de l'inhibition de MSTN dans le tissu adipeux.

La perte de fonction de la myostatine a également été associée à une augmentation de la différenciation *in vitro* des cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse et de l'expression des facteurs ostéogéniques tels que BMP2 et IGF-1 (Hamrick *et al.*, 2007). En revanche, l'administration de myostatine recombinante induit une diminution de l'expression de ces facteurs ostéogéniques. Ces données suggèrent que la myostatine pourrait donc être un facteur anti-ostéogénique. La question d'un effet direct ou indirect de myostatine sur la composition corporelle *via* une régulation de la conversion myogénique/adipogénique/ostéogénique des précurseurs reste donc ouverte.

#### IV.5. Des effets en faveur d'une utilisation raisonnée en agronomie

En agronomie, les bovins porteurs de mutations MSTN, repérés par le caractère « culard », ont été intensivement sélectionnés pour leur rendement en viande élevé. Cependant, ceci s'est accompagné d'effets non désirés sur la production, comme par exemple une baisse de la fertilité et une dystocie, amenant progressivement les éleveurs à s'interroger sur l'élimination des homozygotes « culards » (Bellinge *et al.*, 2005). Ceci semble d'autant plus justifié que la présence d'un seul allèle muté s'accompagne d'une augmentation



significative de la masse musculaire (Smith *et al.*, 1997) et d'une amélioration des performances d'abattage (rendement et conformation de carcasse) en race Limousine ainsi que de la production de carcasses moins grasses, renfermant de taux de lipides intramusculaires et de collagène plus faibles et d'une viande plus claire en race Charolaise (Allais *et al.*, 2008). Ainsi, repérer et ne conserver que les animaux porteurs d'une seule copie mutée permettrait donc de s'affranchir des effets associés aux homozygotes. Chez le Mouton, le caractère « culard » a récemment été expliqué par une mutation créant une cible illégitime pour des micro-ARN sur les ARN MSTN, entraînant leur dégradation et donc l'absence de traduction de la protéine (Clop *et al.*, 2006). Cette mutation n'aboutit pas à une transformation majeure de la morphologie des animaux mais est prometteuse pour obtenir un épaissement des masses musculaires et notamment des gigots et une réduction de l'état d'engraissement. C'est pourquoi l'introgession de cette mutation est en cours en race Lacaune (Laville *et al.*, 2008, séminaire GenAnimal).

#### IV.6. Implications biomédicales

La possibilité d'inhiber l'action de la myostatine a été souvent évoquée comme une stratégie thérapeutique dans la perte de la masse musculaire associée à de nombreuses maladies comme la DMD, le SIDA, la cachexie, le cancer ainsi que le vieillissement.

Une surexpression de MSTN chez des souris adultes est responsable de l'apparition du syndrome de la cachexie provoquant ainsi une atrophie musculaire importante (Zimmers *et al.*, 2002). Elle contribue aussi à la perte de la masse musculaire chez des patients atteints du SIDA (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998a). Lors d'une sarcopénie associée à l'âge, les niveaux d'expression de MSTN ainsi que l'abondance de la protéine ont été révélés significativement plus élevés (Welle, 2002, Leger *et al.*, 2008). Cette augmentation de la myostatine est accompagnée d'une baisse des voies impliquées dans l'hypertrophie musculaire comme la voie IGF-1/Akt (Leger *et al.*, 2008).

L'ensemble des résultats suggère que l'inhibition de l'activité de la myostatine par l'administration soit de son propeptide, soit de son inhibiteur (la follistatine), ou encore par l'administration d'anticorps anti-myostatine jouerait un rôle crucial dans l'amélioration de la masse musculaire.

En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'inhibition de l'activité de la myostatine par la follistatine serait impliquée dans la protection contre la perte de la masse musculaire



lors d'une cachexie cancéreuse (Link *et al.*, 2008). D'autres travaux réalisés sur le modèle de souris dystrophiques mdx ont montré que le blocage de la myostatine par l'administration de son propeptide atténue la dystrophie musculaire en améliorant les performances et la croissance musculaires de ces souris (Bogdanovich *et al.*, 2005). Autre étude de Whittemore *et al.* (2003) réalisée sur des souris dystrophiques mdx a montré que l'administration d'un anticorps monoclonal anti-myostatine améliore la croissance de la masse du muscle squelettique de ces souris.

De plus, des croisements entre des souris dystrophiques mdx (Wagner *et al.*, 2005) ou des souris déficientes en calvéoline-3 présentant une myopathie des membres (Ohsawa *et al.*, 2006) et des souris KO MSTN montrent une amélioration du poids du muscle caractérisée par une augmentation de la taille des fibres (hypertrophie) et de leur nombre (hyperplasie) chez ces souris présentant une double mutation.

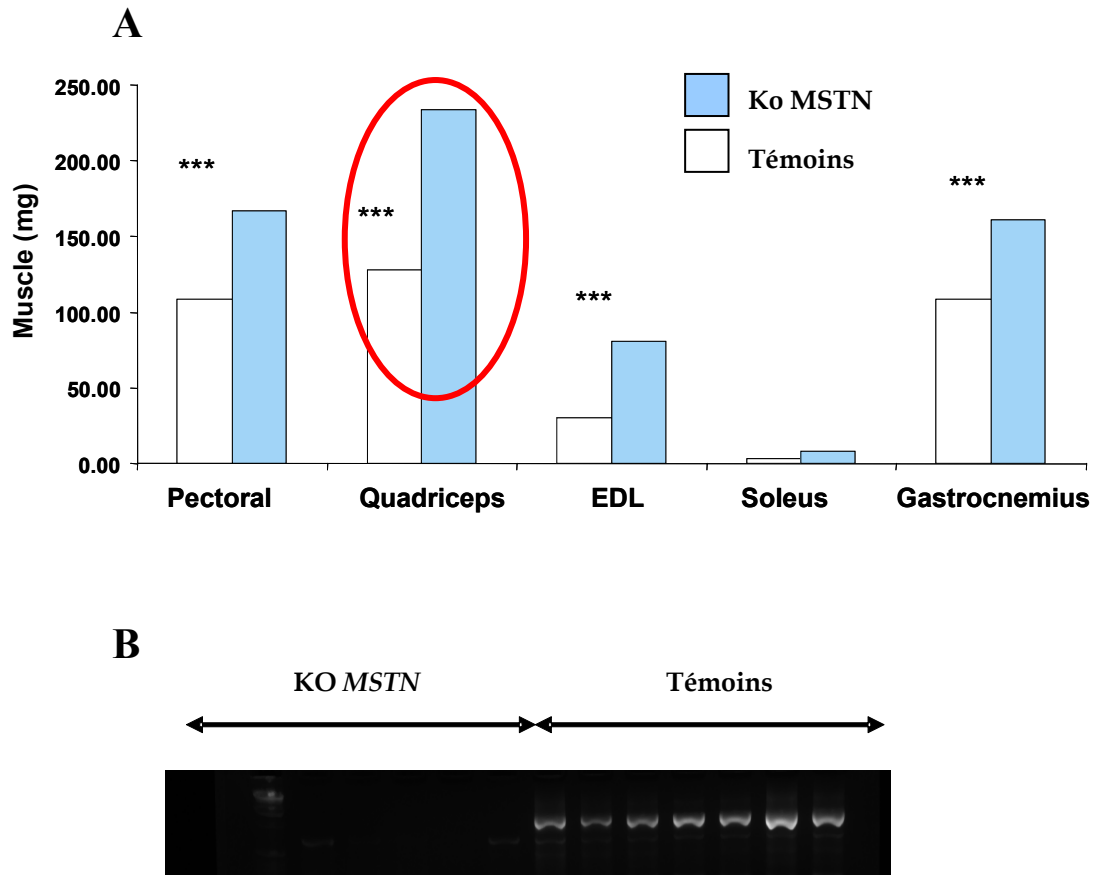
Ainsi, l'inhibition de la myostatine présente une piste thérapeutique à explorer, tout en prenant en considération les effets secondaires à long-terme qui restent encore inconnus.

*L'ensemble des données regroupées dans ce chapitre montrent que la myostatine est impliquée dans le contrôle de la masse musculaire lors de la myogenèse et au cours de la croissance. Elle régule, en effet, la prolifération et la différenciation des myoblastes et des cellules satellites et l'expression des gènes impliqués dans l'atrophie. Des mutations "perte de fonction" du gène de la myostatine chez plusieurs espèces semblent affecter différents processus biologiques expliquant l'hypertrophie que présente ces animaux. Dans cette optique, la myostatine constitue à la fois une cible dans le domaine agricole pour améliorer la croissance musculaire des animaux de boucherie. Elle présente également une cible thérapeutique pour lutter contre les maladies musculaires caractérisées par une atrophie.*





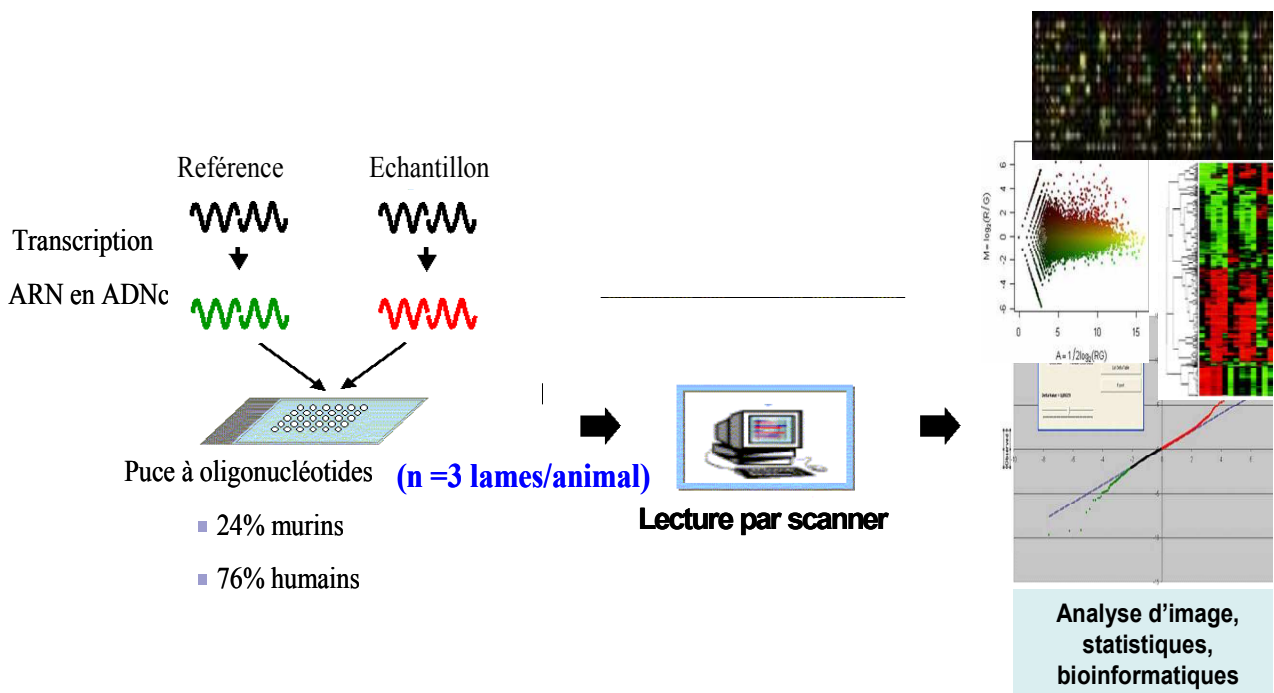
# *Matériels & méthodes*



**Figure 17:** Caractéristiques musculaires des souris ko présentant une invalidation du gène MSTN.

A : Hypertrophie musculaire induite par KO MSTN dans plusieurs muscles

B : Absence des transcrits MSTN révélée par RT-PCR dans le muscle Quadriceps des Souris KO MSTN



**Figure 18:** Représentation schématique de la technique de l'analyse du transcriptome utilisant des puces à ADN.

## I. Animaux et Echantillons

### I.1. Prélèvement du muscle *Quadriceps* de souris (Publications 1 et 2)

Les différents muscles de souris KO MSTN (n=5) et de leurs souris témoins (n=5) ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec J. Reecy, de l'université Iowa (USA). Ces souris ont été sacrifiées à 5 semaines de vie post-natale. Leurs muscles ont été prélevés, pesés, immédiatement congelés dans l'azote et conservés à -80°C jusqu'à leur analyse. Le muscle *Quadriceps* a été choisi pour la réalisation en raison de son hypertrophie très marquée (+87%) par rapport aux autres muscles prélevés (Figure 17).

### I.2. Prélèvement du muscle ST des bovins (Publication 3)

Afin de répondre à la problématique de ma thèse, les différentes cibles potentielles de la MSTN révélées dans le modèle Souris ont été validées dans le modèle Bovin.

Ainsi, des échantillons issus de deux groupes d'animaux ont été analysés. Le premier groupe d'animaux comporte des fœtus de 260 jours *pc*: 3 fœtus culards de race Charolaise issus de la lignée INRA95 homozygotes pour la mutation Q204X et 3 fœtus non culards de race Charolaise.

Le second groupe se compose de 4 vaches culardes et de 4 vaches non culardes. Tous les animaux étaient de race Charolaise et d'âge variable allant de 1 à 7 ans. Toutes les vaches culardes sont homozygotes pour la mutation Q204X.

Le muscle *Semitendinosus* (ST) a été prélevé à l'abattage chez les fœtus et par biopsie chez les vaches.

## II. Transcriptomique

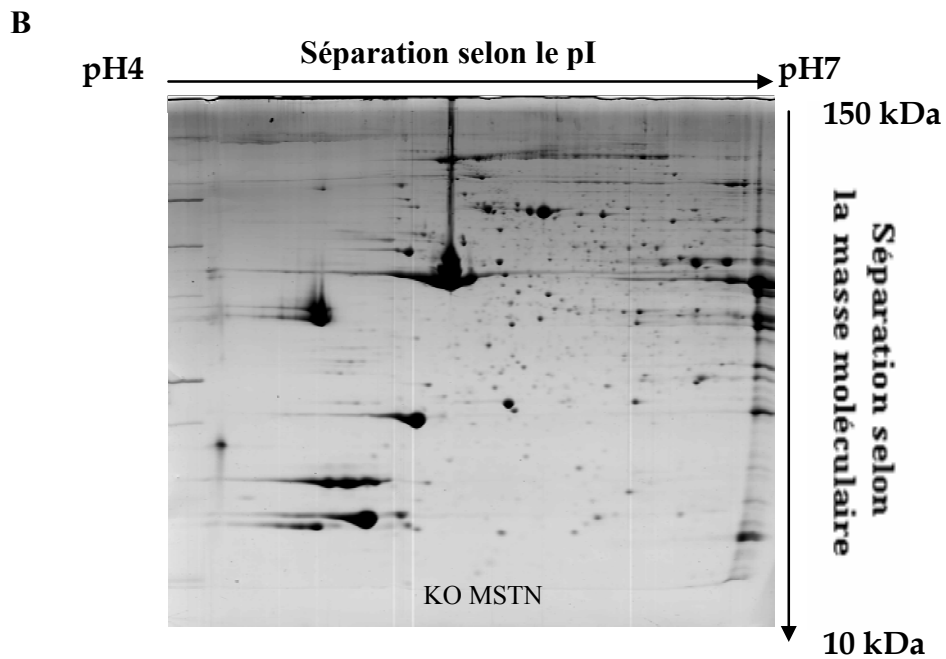
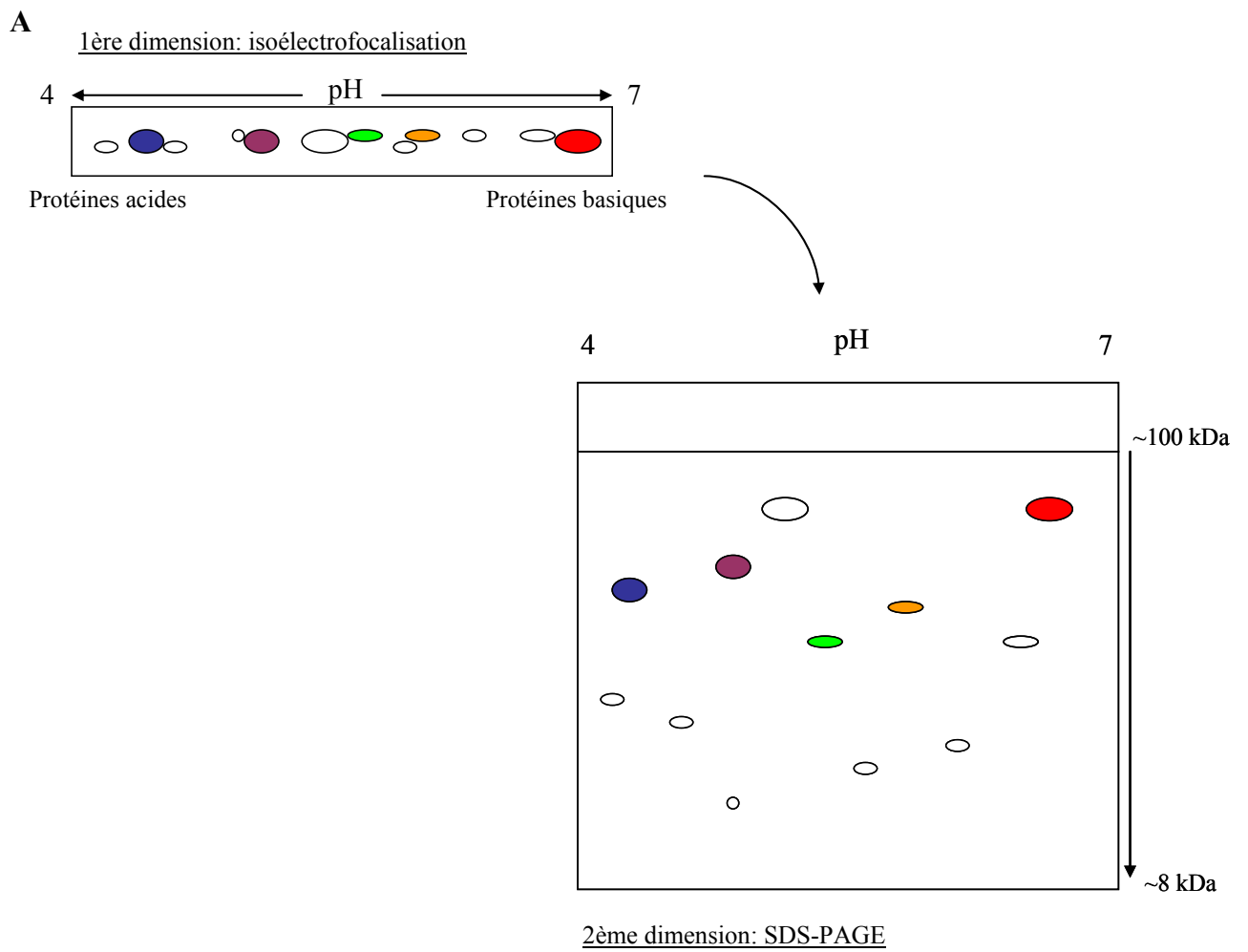
La transcriptomique permet d'étudier les niveaux d'expression d'un grand nombre de gènes à la fois par la technique de puces à ADN (Figure 18) dans de multiples conditions biologiques. Pour l'analyse du transcriptome musculaire, j'ai utilisé des puces à ADN contenant 6473 oligonucléotides (76% humains et 24% murins) représentatifs de gènes exprimés dans le muscle ("Myochips" produite par OUEST-genopole® de Nantes, France).



L'ARN total a été extrait à partir des échantillons de muscle *Quadriceps* selon la technique d'extraction au TRIZOL™ (Life Technologies) et suivant les recommandations du fabricant. L'ARN est ensuite purifié et traité avec l'aide de l'ADNase en utilisant le kit Mini RNeasy® (Qiagen, France). La concentration et la qualité des ARN ont été vérifiées à l'aide du bio-analyseur Agilent 2100 (Lab Chip Agilent technology) comme décrit précédemment (Cassar-Malek et al., 2007). Chaque échantillon a été comparé à un échantillon de référence composé de transcrits de muscles squelettiques isolés de différents muscles de quatre lignées de souris : Balb, C57bl6 et B129 (de différentes tranches d'âge et sexe) et de culture de cellules myogéniques murines C2C12.

Dix µg d'ARN ont été rétro-transcrits en ADNc, ces derniers ont été purifiés sur colonnes du kit CyScribe™ GFX™ purification (Amersham Pharmacia Biotech). Les ADNc de chaque échantillon ainsi que ceux de l'échantillon de référence ont été marqués respectivement par les fluorochromes cyanine 3 (Cy3) et cyanine 5 (Cy5) (Cy3-dCTP/Cy5-dCTP, Amersham). Les ADNc marqués de différents échantillons ont été hybridés individuellement sur les Myochips (à raison de trois puces répliqués par échantillon d'intérêt). Après lavage, les lames ont été scannées sur un Affymetrix 428™ Array Scanner. Les images TIFF ont été analysées à l'aide du logiciel GenePix Pro V6 (Axon instruments). Les données brutes ont été normalisés et filtrées en utilisant le programme MADSCAN (MicroArray Data Suites of Computed ANalysis) disponible sur le site de la plate-forme "puces à ADN" de Génomole Ouest de Nantes: (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/>, 15). Ce prétraitement informatique a permis de ne retenir que les ratios Cy3/Cy5 fiables.

Afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés, les ratios Cy3/Cy5 ont été statistiquement analysés à l'aide de la méthode SAM (Significance Analysis of Microarray, Tusher et al.) avec un taux de fausses découvertes fixé à 5%. Pour cette analyse 4, Souris KO MSTN vs 4 témoins ont été comparés avec 3 mesures répétées par échantillon. Seuls 4 animaux sur 5 analysés ont été retenus pour raison technique (qualité mauvaise de 2 lames d'un lot).



**Figure 19:** Electrophorèse bidimensionnelle.

A : Principe de la technique.

B : Image d'un gel.

### III. Protéomique

La protéomique s'intéresse à l'ensemble des protéines présentes (protéome) dans une cellule ou un tissu, à un temps précis, dans des conditions physiologiques déterminées. Cette approche a été retenue afin de réaliser une étude différentielle de l'abondance des protéines dans les muscles *Quadriceps* de souris KO MSTN en comparaison de ceux de leurs témoins.

#### III.1. Extraction des protéines pour l'analyse 2-DE

L'extraction des protéines a été effectuée selon la technique décrite par Bouley et al. (2004). 50-100 mg de muscle congelé ont été homogénéisés à l'aide d'un polytron dans un tampon de lyse contenant urée 8,3 M, thiourée 2 M, 1% DTT CHAPS 2% et 2% IPG de pH 3-10 puis centrifugés à 10000 g pendant 30 min. Le surnageant a été récupéré et la concentration de protéines pour chaque échantillon a été déterminée comme décrit dans le kit PlusOne 2-DE Quant (Amersham, Biosciences). La concentration des protéines a été déterminée en utilisant le kit 2-DE Quant (Amersham Uppsala, Suède), en utilisant la BSA (bovine serum albumin) comme standard. La concentration moyenne de protéines était de  $9,6 \text{ mg. } \mu\text{l}^{-1} \pm 1.48 \text{ } \mu\text{g.} \mu\text{l}^{-1}$ .

#### III.2. Séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE)

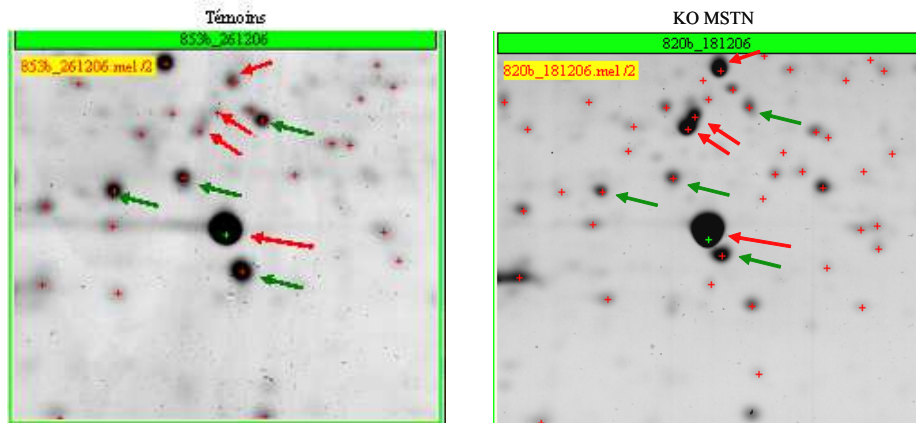
La séparation 2-DE a été réalisée selon la méthode décrite par Bouley et al. (2004). Elle consiste à séparer les protéines selon leur point isoélectrique pI dans une dimension isoélectrofocalisation (IEF) en gradient de pH 4-7 et selon la masse moléculaire dans l'autre dimension (Figure 19).

La première dimension appelée Isoélectrofocalisation (IEF) a été réalisée dans l'appareil Protean IEF cell (Bio-Rad) en utilisant des strips IPG de 18 cm, couvrant une gamme de pH de 4-7 puis ces strips ont été réhydratés avec un volume de 330  $\mu\text{l}$  contenant 700  $\mu\text{g}$  du mélange de protéines à analyser. L'IEF a été réalisée selon le programme décrit auparavant par Bouley et al. (2004).

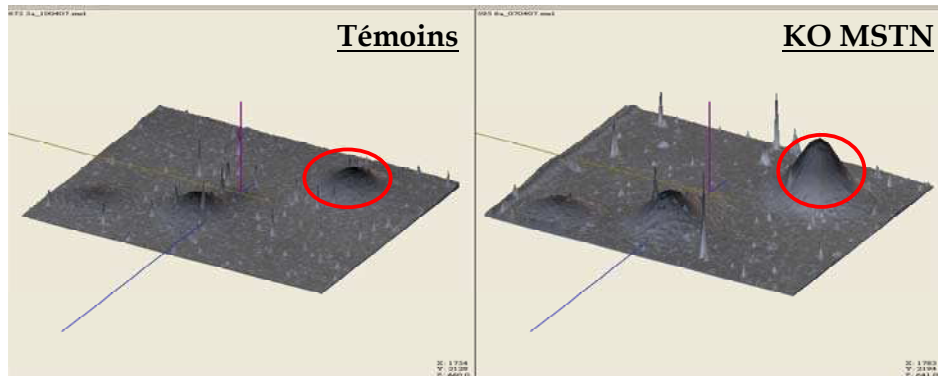
A la fin de l'IEF, les bandes de strips ont été équilibrées dans des solutions de DTT et de Iodoacétamide puis transférées sur un gel polyacrylamide (11% T et 2,6% C). Les gels ont été placés dans la cuve Bio-Rad Doceca cell, les protéines ont été séparées selon leur masse moléculaire. La séparation a été réalisée selon le programme suivant: 200V pendant 1 heure,



A



B



**Figure 20:** Exemple de spots déclarés différentiellement abondants à l'aide du logiciel '*ImageMaster 2D platinum*'.  
A : Flèches vertes: spots sous-abondants et flèches rouges: spots sur-abondants. B : visualisation en 3D d'un spot sur-abondant chez les souris KO MSTN.

500V pendant 2 heures, 1000V pendant 1 heure, 2400V pendant 2 heures et 3500 pendant 19 heures.

Les gels 2-DE ont été colorés au bleu de coomassie G-250 et numérisés sur un scanner à densité optique (ImageScanner, Amersham) pour l'analyse d'image. Les différents gels ont été conservés dans une solution de sulfate d'ammonium à 15% dans des sacs scellés hermétiquement et conservés à 4°C pour les identifications futures des spots protéiques d'intérêt.

Lors de l'électrophorèse bidimensionnelle, 5 animaux par groupe (5 Souris KO MSTN et 5 Souris témoins) ont été représentés par 2 gels chacun.

### III.3. Analyses d'images

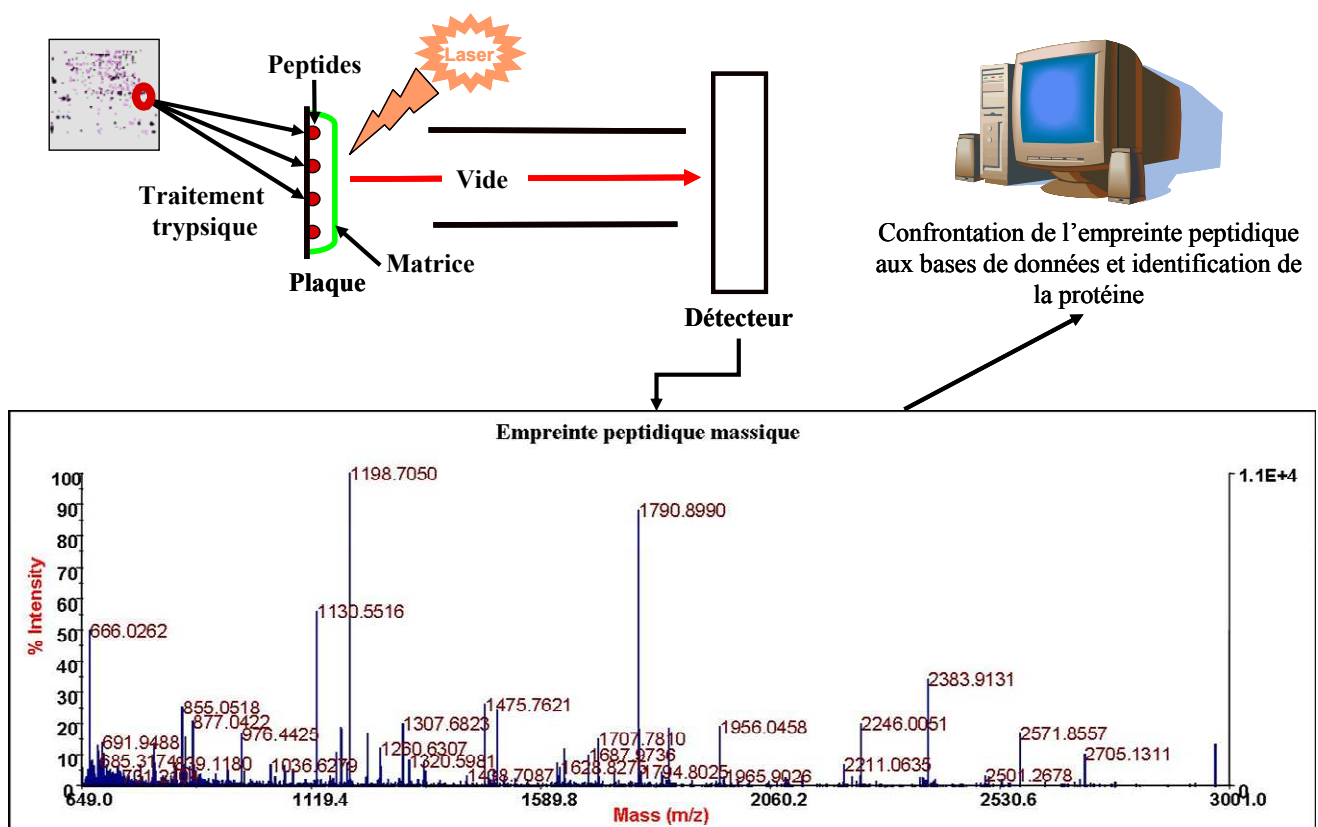
Les images des gels ont été analysées à l'aide du logiciel ImageMaster 2D platinum (Amersham). Après une étape de nettoyage des gels, les différents gels ont été appariés à un gel de référence artificiel contenant l'ensemble des spots. Les différents spots protéiques présents dans les différents gels ont été appariés à leurs spots protéiques correspondants dans le gel de référence. Ce dernier a été enrichi manuellement lorsqu'un spot reproductible du gel était absent.

L'abondance relative de chaque spot protéique a été exprimée en %volume après normalisation par rapport au volume moyen de 249 spots protéiques strictement communs à l'ensemble des gels. La gestion des valeurs manquantes et la normalisation des données ont été effectuées comme décrit par Meunier *et al.*, (2005).

L'approche statistique utilisée pour analyser les données protéomiques est la méthode SAM (Significance Analysis of Microarray), la même que celle utilisée pour analyser les données transcriptomiques. Cette méthode a été développée au départ pour les analyses transcriptomiques (Tusher *et al.*, 2001), puis elle a été adaptée pour des applications protéomiques (Meunier *et al.*, 2005). Il s'agit d'un test de Student modifié et le taux de fausses découvertes a été fixé à 5%.

### III.4. Identification des protéines

Les spots protéiques révélés comme différentiellement abondants par l'analyse SAM (Figure 20) ont été excisés des gels 2-DE et identifiés par spectrométrie de masse sur la plateforme PEFM du centre de Theix avec l'assistance du Dr C. Chambon. Les spots protéiques d'intérêt



**Figure 21: Identification des protéines par Spectrométrie de Masse : MALDI-TOF**

ont été décolorés, déshydratés et ensuite hydrolysés en peptides par la trypsine. Le mélange peptidique obtenu a été déposé sur une cible en présence de matrice puis il a été analysé par MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) - TOF (Time of Flight) (Figure 21).

Cette analyse a consisté, tout d'abord, en la mesure des masses d'un mélange peptidique obtenu par digestion enzymatique de la protéine inconnue (identification par la recherche d'empreinte peptidique massique). Ensuite, l'identification de la protéine inconnue a été réalisée par des outils informatiques reliés aux bases de données (ex. SuissProt). Pour interroger les moteurs de recherche (ex : ProFound, MS-FIT), différents critères ont été renseignés: la banque de donnée à interroger, la famille, le genre, l'espèce à partir desquels la protéine est isolée.

#### IV. Validation des données

L'expression et l'abondance des gènes et des protéines d'intérêt, révélés différentiellement exprimés par les deux approches transcriptomique et protéomique, ont été confirmées par les techniques de références RT-PCR et Western-blot.

##### IV.1. Par Western-blot

Le Western-blot a été utilisé pour valider les principales protéines différentiellement exprimées. Ces protéines ont été séparées par électrophorèse monodimensionnelle sur un gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Après leur migration (selon la condition: 80V pendant 20 min puis 120V pendant 1h30), les protéines ont été transférées à 240mA pendant 1 heure sur des membranes PVDF Millipore (Dutscher Dominique SAS, France). Après transfert, les membranes ont été saturées avec une solution de T-TBS contenant 5 % de lait écrémé pendant 1h30 afin de saturer les sites non spécifiques et incubées avec le premier anticorps, destiné à révéler la protéine d'intérêt, dilué dans le T-TBS contenant 1% de lait écrémé pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. Après trois lavages de 5 min dans du PBS contenant 1% de lait écrémé, les membranes ont été incubées avec le second anticorps dilué au 1/20 000<sup>e</sup> pendant une heure à température ambiante sous agitation douce.

L'activité de l'enzyme couplée à l'anticorps secondaire a été révélée par un kit de chimioluminescence. La lumière émise a permis d'impressionner un film photographique qui



a été scanné par Expression 10000XL PRO (Epson). Les bandes ont ensuite été quantifiées en utilisant le logiciel ImageQuant TL v2003 (Amersham) et le volume de chaque bande a été exprimé en unité arbitraire.

#### IV.2. Par RT-PCR

La validation de l'expression des différents gènes d'intérêt a été réalisée par la technique de RT-PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant le marqueur SYBR Green I dye (Applied Biosystems). Cette molécule est un intercalant qui, au moment de l'étape de dénaturation de la PCR, s'incorpore dans la molécule d'ADN double brin.

Différents couples d'amorces ont été dessinés à l'aide du logiciel Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) pour amplifier les gènes d'intérêt.

La PCR a été effectuée dans l'appareil Step One Plus (Applied Biosystems) en respectant les conditions de cycle suivantes : dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min suivie de 40 cycles : (95°C pendant 15sec puis 58°C ou 60°C pendant 45sec) et de la melting curve.

#### IV.3. Par RT<sup>2</sup> PCR Array

Des plaques PCR array commerciales (SABiosciences) ont été utilisées pour étudier le profil d'expression d'un ensemble de gènes relatifs à l'apoptose et dont les conditions de l'utilisation sont décrites dans la partie "matériel et méthodes" de la publication 2.

#### IV.4. Validations des données chez les bovins

En respectant le même protocole que celui utilisé chez la Souris, les extractions des ARNs et des protéines ont été effectuées sur les différents muscles ST prélevés.

L'expression et l'abondance des gènes et des protéines d'intérêt ont été confirmés par RT-PCR et par Western-blot. Ces deux techniques ont été préalablement décrites dans la partie validation des données chez la Souris en utilisant des amorces et des anticorps spécifiques chez le Bovin.

**SOURCE**  
GeneReport  
*M. musculus*

# Mybph

## Myosin binding protein H

[UniGene](#) [LocusLink](#)

**Aliases**

- myosin binding protein H

**Chromosomal Location**

Chromosome/ Cytoband	1 E4
-------------------------	------

**Microarray Gene Expression Data**

Data available	<a href="#">Show Gene Expression Data</a>
----------------	---

**SwissProt Information**

SwissProt Accession No.	<a href="#">P70402</a> Myosin-binding protein H (Mus musculus); 100% similarity over 483 a.a.
Function	binds to myosin; probably involved in interaction with thick myofilaments in the a-band.
Tissue Specificity	skeletal muscle.
Similarity	belongs to the immunoglobulin superfamily. mybp family.
Similarity	contains 2 fibronectin type-iii domains.
Similarity	contains 2 ig-like c2-type (immunoglobulin-like) domains.
SwissProt Copyright	This SWISS-PROT entry is copyright. It is produced through a collaboration between the Swiss Institute of Bioinformatics and the EMBL countries - the European Bioinformatics Institute. There are no restrictions on its use by non-profit institutions as long as its content is in no way modified and this statement is not removed. Usage by and for commercial entities requires a license agreement (See <a href="http://www.ebi.ac.uk/ebis/home/faq">http://www.ebi.ac.uk/ebis/home/faq</a> , or send an email to <a href="mailto:license@ebi.ac.uk">license@ebi.ac.uk</a> ).

**Annotations**

Gene Ontologies	Ontology	Annotation	Evidence	Source
	Molecular Function	<a href="#">Protein binding</a>	IEA	MGI
		<a href="#">Striated muscle contraction</a>	IEA	MGI
	Biological Process	<a href="#">Cell adhesion</a>	IEA	MGI
		<a href="#">Muscle development</a>	IEA	MGI
	Cellular Component	<a href="#">Striated muscle thick filament</a>	IEA	MGI

**UniGene & EST Expression Information**

Outil Source

**DAVID Bioinformatics Resources 2007**  
National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH

147007	ubiquitin-cytochrome c reductase core protein 1	Related Genes	Mus musculus
146639	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Related Genes	Mus musculus
32829	lactate dehydrogenase b	Related Genes	Mus musculus
14094	heat shock protein 9a	Related Genes	Mus musculus
145246	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	Related Genes	Mus musculus
26485	heat shock protein, alpha-crystallin-related, b6	Related Genes	Mus musculus
30859	atp synthase, hv-transporting mitochondrial f1 complex, beta subunit	Related Genes	Mus musculus
16689	isocitrate dehydrogenase 3 (nad+) alpha	Related Genes	Mus musculus
14301	dihydrolipoamide s-acetyltransferase (e2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	Related Genes	Mus musculus
UP_SEQ_FEATURE	sequence conflict, transit peptide:Mitochondrion,		
KEGG_PATHWAY	OXIDATIVE PHOSPHORYLATION,		
INTERPRO_NAME	Peptidase M16, zinc-binding site, Peptidase M16, C-terminal, Peptidase M16, N-terminal,		
GOTERM_CC_ALL	cell, cytoplasm, envelope, intracellular, intracellular membrane-bound organelle, intracellular organelle, membrane, membrane-bound organelle, mitochondrial electron transport chain, mitochondrial envelope, mitochondrial inner membrane, mitochondrial membrane, mitochondrion, organelle, organelle envelope, organelle inner membrane, organelle membrane,		
SP_PIR_KEYWORDS	electron transport, inner membrane, membrane, mitochondrion, oxidoreductase, respiratory chain, transit peptide, transport,		
GOTERM_BP_ALL	cellular macromolecule metabolism, cellular metabolism, cellular physiological process, cellular process, cellular protein metabolism, electron transport, establishment of localization, generation of precursor metabolites and energy, localization, macromolecule metabolism, metabolism, physiological process, primary metabolism, protein metabolism, proteolysis, transport,		
GOTERM_MF_ALL	carrier activity, catalytic activity, cation transporter activity, endopeptidase activity, hydrogen ion transporter activity, hydrolase activity, ion transporter activity, metalloendopeptidase activity, monovalent inorganic cation transporter activity, oxidoreductase activity, oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, cytochrome as acceptor, peptidase activity, primary active transporter activity, transporter activity, ubiquinol-cytochrome-c reductase activity,		
UP_SEQ_FEATURE	binding site:Thiamine pyrophosphate, transit peptide:Mitochondrion,		
KEGG_PATHWAY	GLYCOLYSIS / GLUCONEOGENESIS, VALINE, LEUCINE AND ISOLEUCINE BIOSYNTHESIS, PYRUVATE METABOLISM, BUTANOATE METABOLISM,		
PIR_SUPERFAMILY_NAME	SF00015S:pyruvate dehydrogenase, E1 component, beta subunit,		
INTERPRO_NAME	Transketolase, central region, Transketolase, C-terminal, Transketolase, C-terminal-like,		
GOTERM_CC_ALL	cell, cytoplasm, intracellular, intracellular membrane-bound organelle, intracellular organelle, membrane-bound organelle, mitochondrion, organelle,		
SP_PIR_KEYWORDS	flavoprotein, glycolysis, mitochondrion, oxidoreductase, pyruvate, thiamine pyrophosphate, transit peptid		

Outil DAVID

**Figure 22: Exemple d'outils et applications utilisées pour les données de génomique.**

<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>

## V. Analyses bioinformatiques

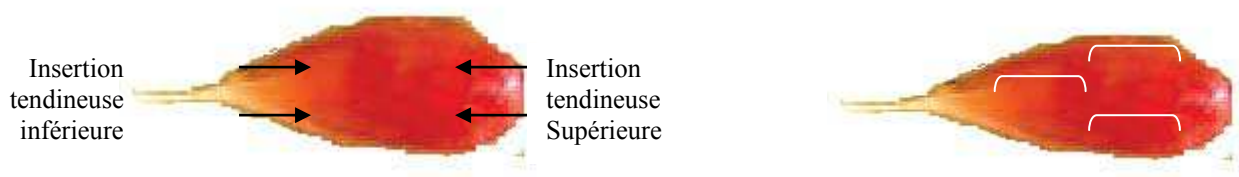
Pour comprendre la fonction biologique ou les mécanismes moléculaires des principales cibles de la MSTN, des outils bioinformatiques tels que Genomatix, DAVID, SOURCE et PANTHER ont été utilisés pour l'identification des fonctions des gènes d'intérêt et l'outil String pour déterminer les réseaux d'interactions protéines/protéines. Ces outils ont permis aussi de consulter les co-citations concernant ces gènes et ces protéines dans la littérature (Figure 22). De plus, ils ont permis d'enrichir les connaissances sur les fonctions biologiques, la localisation cellulaire, la fonction moléculaire des gènes et des protéines concernés. Les données obtenues à partir de ces outils ont permis de visualiser les voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) et de classer les gènes et les protéines par fonction biologique.

## VI. Mesure de la fragmentation de l'ADN sur coupes histologiques

A l'issue des analyses transcriptomiques et protéomiques, la voie de Survie cellulaire / Apoptose s'est avérée être une cible potentielle de la myostatine. C'est pourquoi la méthode de TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) a été choisie pour mesurer la fragmentation de l'ADN, une des caractéristiques du processus de l'apoptose.

La méthode TUNEL a été utilisée pour détecter et quantifier les noyaux apoptotiques présents sur des coupes de muscle *Quadriceps*. J'ai analysé 3 coupes pour chacune des souris (4 souris par condition). Les coupes ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% dans du PBS pH 4-7, perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,1% et du citrate de sodium à 0,1% et incubées avec le mélange réactionnel TUNEL [In situ cell death detection kit, fluorescein (Roche)]. Tous les noyaux présents sur les coupes ont été détectés à l'aide du fluorochrome Hoechst 33342 Bisbenzimidazole (Sigma). Les noyaux TUNEL-positifs et Hoescht-positifs ont été visualisés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Labophot-2, Nikon), en utilisant les longueurs d'onde d'excitation de 450-490 nm et 360-370 nm respectivement. Deux images de la même zone, représentant une surface de champ de vision de 387µm x 290µm, ont été numérisées à chaque longueur d'onde. Pour chaque coupe, 6 zones ont été numérisées par échantillon. Les images ont été automatiquement analysées à l'aide d'un programme informatique développé au laboratoire sous Visilog v6.4 (Noesis, France).





**Figure 23: Électrotransfert de gène.**

Site d'injection d'ADN (flèches) et sites d'implantation des électrodes (crochets blancs) dans le muscle *Tibialis anterior* de Souris

## VII. Electrotransfert du gène MSTN

### VII.1. Animaux

Les 22 animaux utilisés au cours de cette expérience sont des souris males adultes, de race C57BL6J, âgées de 13 semaines (24-26g). Elles ont été gardées à l'animalerie à raison de 5 maximum par cage pendant une semaine. Le jour de l'électrotransfert, les animaux ont été anesthésiés avec une injection intrapéritonéale du mélange anesthésiant (Kétamine + Xylazine+ NaCl 9%) (60 mg/Kg de poids corporel).

### VII.2. Injection intramusculaire

Pour l'électrotransfert du gène, le courant électrique a été introduit à l'aide d'électrodes aiguilles écartées de 4 mm. Les électrodes ont été implantées de façon à encadrer la zone d'injection. Celles-ci ont été insérées de façon parallèle à l'axe de la fibre et déplacées de l'extérieur vers l'intérieur de la patte afin de stimuler la totalité de la largeur du muscle. En général, 3 implantations ont été alors nécessaires.

Le générateur de courant utilisé a été spécifiquement conçu par le Laboratoire de Saint-Etienne en collaboration avec la société «Electronique et Informatique du Pilat».

L'injection d'un vecteur (pcDNA3.1-Zeo) contenant le gène MSTN (Invitrogen, Carlsbad;(Ríos *et al.*, 2001) a été effectuée directement dans le muscle *Tibialis anterior* (Ta) au niveau de la patte gauche (patte échantillon) et un vecteur pCMV- $\beta$ -galactosidase (Clontech; Palo Alto, CA) au niveau de la patte droite (patte témoin). Le volume nécessaire pour chaque injection a été calculé de façon à injecter 80 $\mu$ g d'ADN par patte. L'injection a été réalisée à 2 niveaux différents du muscle Ta (2 injections réalisées par l'abord inférieur et 2 par l'abord supérieur) de façon à injecter la totalité du muscle (**Figure 23**)

### VII.3. Prélèvement tissulaire et conditionnement des échantillons

Sept jours après l'électrotransfert, les animaux ont été anesthésiés et les muscles Ta transfectés de la patte droite et ceux de la patte gauche ont été prélevés pour des analyses histochimiques et biochimiques. Le prélèvement a été effectué sur l'animal vivant profondément anesthésié et les muscles entiers ont été déposés sur liège, mis dans des tubes et



immédiatement congelés dans l'azote liquide. A la suite du prélèvement, l'animal a été sacrifié par décérébration.

#### VII.4. Conditionnement pour analyse histologique

Des coupes transversales de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur des muscles Ta gauche et droit de 10 souris ont été réalisées à  $-25^{\circ}\text{C}$  à l'aide d'un Cryostat microtome (microtome 500). Ces coupes ont été déposées sur une lame de verre et congelées en vue de leur analyse.



# *Résultats & Discussion*



*Article I: Chelsh et al., 2009 publié dans  
"BMC Genomics"*





## I. Article I: Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets.

### I.1. Introduction à l'article I

La myostatine, un facteur de croissance de la superfamille des TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) identifié en 1997 (McPherron *et al.*, 1997a), régule négativement la croissance du muscle squelettique en contrôlant le nombre de fibres d'une part, et la croissance de chacune d'entre elles d'autre part. Elle est sécrétée par les cellules musculaires principalement au cours du développement. Des études réalisées au cours des dix dernières années ont montré son rôle crucial dans la régulation de l'homéostasie musculaire pendant la période post-natale. Une inactivation par recombinaison homologue («knock-out» ou «KO» MSTN) a été réalisée chez la Souris (McPherron *et al.*, 1997a). Elle induit un phénotype semblable à celui observé chez des bovins «culards» et des souris «compact», pour lesquels le phénotype hypermusclé a été relié à des mutations "perte de fonction" dans le gène MSTN (Grobet *et al.*, 1997, Szabo *et al.*, 1998). La perte de fonction de ce facteur est associée principalement à une augmentation du nombre de fibres (hyperplasie) mais également à une augmentation de taille des fibres, en particulier chez la Souris chez laquelle cet effet est plus marqué que chez le Bovin (+ 100 à 200%, (McPherron *et al.*, 1997a).

Les mécanismes par lesquels la myostatine exerce son action avaient en partie été élucidés au début de ma thèse : action anti-proliférative sur les cellules musculaires [myoblastes au cours du développement (Thomas *et al.*, 2000), cellules satellites (McCroskery *et al.*, 2003)], et inhibition de leur fusion, ces deux mécanismes concourant à limiter le nombre de fibres au cours du développement et participant ainsi au déterminisme du nombre total de fibres. Cependant, la question de l'existence d'autres mécanismes avait été posée suite à l'analyse des profils moléculaires dans les muscles des bovins culards en comparaison de leurs témoins [protéome (Bouley *et al.*, 2005), transcriptome (Cassar-Malek *et al.*, 2007)].

Cette première publication avait pour objectif d'identifier de nouvelles cibles moléculaires de la myostatine qui pourraient participer à la régulation de la masse musculaire. La stratégie retenue a consisté, dans un premier temps, à comparer le protéome et le transcriptome du muscle *Quadriceps* de souris KO MSTN (McPherron *et al.*, 1997a) à ceux de leurs témoins. Ceci devait permettre de révéler des protéines et des transcrits dont l'abondance dans les muscles était modifiée en l'absence de myostatine. L'analyse de ces signatures moléculaires



devait ainsi permettre d'identifier notamment des voies biologiques impliquées dans l'hypertrophie musculaire. Cette approche originale n'avait jamais été encore utilisée et a bénéficié d'une subvention de l'AFM et d'une collaboration avec le Pr J. Reecy (Iowa State University, USA).



Research article

Open Access

## Molecular profiles of Quadriceps muscle in *myostatin*-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets

Ilham Chelh<sup>1</sup>, Bruno Meunier<sup>1</sup>, Brigitte Picard<sup>1</sup>, Mark James Reecy<sup>2</sup>, Catherine Chevalier<sup>3</sup>, Jean-François Hocquette<sup>1</sup> and Isabelle Cassar-Malek\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Equipe Croissance et Métabolisme du Muscle, Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France, <sup>2</sup>Iowa State University, Animal Science Dept, 2255 Kildee Hall, Ames, IA 50011-3150, USA and <sup>3</sup>Plateforme Puces à ADN, Ouest Génomique, U915, Institut du Thorax, Faculté de Médecine 1, rue Gaston Veil, 44035 Nantes cédex, France

Email: Ilham Chelh - [ilham.chelh@clermont.inra.fr](mailto:ilham.chelh@clermont.inra.fr); Bruno Meunier - [bruno.meunier@clermont.inra.fr](mailto:bruno.meunier@clermont.inra.fr);

Brigitte Picard - [Brigitte.Picard@clermont.inra.fr](mailto:Brigitte.Picard@clermont.inra.fr); Mark James Reecy - [jreecy@iastate.edu](mailto:jreecy@iastate.edu);

Catherine Chevalier - [catherine.chevalier@nantes.inserm.fr](mailto:catherine.chevalier@nantes.inserm.fr); Jean-François Hocquette - [Jean-Francois.Hocquette@clermont.inra.fr](mailto:Jean-Francois.Hocquette@clermont.inra.fr);

Isabelle Cassar-Malek\* - [isabelle.cassar-malek@clermont.inra.fr](mailto:isabelle.cassar-malek@clermont.inra.fr)

\* Corresponding author

Published: 27 April 2009

Received: 18 November 2008

BMC Genomics 2009, 10:196 doi:10.1186/1471-2164-10-196

Accepted: 27 April 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/196>

© 2009 Chelh et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Myostatin (MSTN), a member of the TGF- $\beta$  superfamily, has been identified as a negative regulator of skeletal muscle mass. Inactivating mutations in the MSTN gene are responsible for the development of a hypermuscular phenotype. In this study, we performed transcriptomic and proteomic analyses to detect altered expression/abundance of genes and proteins. These differentially expressed genes and proteins may represent new molecular targets of MSTN and could be involved in the regulation of skeletal muscle mass.

**Results:** Transcriptomic analysis of the Quadriceps muscles of 5-week-old MSTN-null mice ( $n = 4$ ) and their controls ( $n = 4$ ) was carried out using microarray (human and murine oligonucleotide sequences) of 6,473 genes expressed in muscle. Proteomic profiles were analysed using two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. Comparison of the transcriptomic profiles revealed 192 up- and 245 down-regulated genes. Genes involved in the PI3K pathway, insulin/IGF pathway, carbohydrate metabolism and apoptosis regulation were up-regulated. Genes belonging to canonical Wnt, calcium signalling pathways and cytokine-receptor cytokine interaction were down-regulated. Comparison of the protein profiles revealed 20 up- and 18 down-regulated proteins spots. Knockout of the MSTN gene was associated with up-regulation of proteins involved in glycolytic shift of the muscles and down-regulation of proteins involved in oxidative energy metabolism. In addition, an increased abundance of survival/anti-apoptotic factors were observed.

**Conclusion:** All together, these results showed a differential expression of genes and proteins related to the muscle energy metabolism and cell survival/anti-apoptotic pathway (e.g. DJ-1, PINK1, I4-3-3 $\epsilon$  protein, TCTP/GSK-3 $\beta$ ). They revealed the PI3K and apoptotic pathways as MSTN targets and are in favour of a role of MSTN as a modulator of cell survival in vivo.

## Background

Myostatin (MSTN), a member of the TGF- $\beta$  superfamily, has emerged as a key factor of muscle development and maintenance of muscle mass homeostasis [1]. This has strengthened the idea that MSTN is a potential target for novel therapeutic strategies to improve the disease symptoms with potential long-term benefits in a variety of muscular dystrophies [2], or for improving the management of muscular growth in livestock animals [3].

Inactivating mutations of the MSTN gene are responsible for the development of a hypermuscular phenotype in cattle [4,5], dogs [6], mice [7] and humans [8]. The hypermuscular phenotype associated with constitutive MSTN loss-of-function results from both hyperplasia (increased number of fibers) and hypertrophy (increased size of individual fibers). An hypermuscular phenotype of the same magnitude as that observed for constitutive knockout has also been observed in mice with a conditional MSTN knockout (postnatal inactivation of MSTN) generated by a Cre-Lox system [9]. This demonstrated that MSTN modulates the muscle mass throughout development. The ability of MSTN to control myoblast cell proliferation and differentiation has been demonstrated. Examination of the molecular action of MSTN has revealed an inhibitory influence on proliferation through the control of cell cycle progression [10,11]. MSTN also inhibits myoblast differentiation [12] partially through a decreased expression of Myogenic Regulatory Factors (reviewed by [13]). Myogenin and p21CKI have been identified as the major physiological targets of endogenous MSTN in murine cells [14]. MSTN has also been shown to negatively regulate satellite cell activation and self-renewal [15] and this action may involve a regulation of Pax7 [16]. Furthermore, we recently demonstrated that MSTN can regulate satellite cell proliferation via regulation of WNT4 [17].

Recent data established that MSTN induces muscle atrophy. In mice, muscle disuse-induced atrophy generated by hindlimb unloading is associated with a reversible increase in MSTN mRNA abundance [18]. MSTN has been implicated in muscle wasting in various diseases (HIV, cachexia, cancer, Duchenne's muscular dystrophy) and ageing [19]. Transgenic mice that overexpress MSTN selectively in skeletal muscle have lower muscle mass [20]. In adult rats, ectopic MSTN expression induces atrophy of skeletal muscle as shown by a significant decrease in muscle mass, fiber cross-sectional area and protein content [21]. This is associated with decreased expression of genes structural proteins (myosin heavy chain IIb, troponin I and desmin) and myogenic transcription factors. Moreover, inhibition of MSTN rescues the muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice [22] and protects against muscle atrophy due to glucocorticoid treatment [23]. If some of

the mechanisms by which MSTN contributes to atrophy have been clarified, e.g. FOXO1 activation and subsequent activation of ubiquitin proteolytic system [24], the relative contribution of MSTN to the regulation of the balance between atrophic and hypertrophic processes in muscle remains to be further elucidated. Some questions remain to be answered such as the possibility that MSTN might inhibit muscle hypertrophy rather than induce atrophy [24,25].

We have previously analysed the metabolic profile of double-muscling cattle [26] and more recently the molecular profiles in muscle in the context of MSTN loss-of-function [27,28] and hypothesised that these should help in the understanding of molecular mechanisms by which MSTN regulates muscle mass homeostasis. The main objective of the present study was to identify MSTN targets involved in the regulation of muscle mass. For this, we examined the transcriptional and proteomic profiles in the *Quadriceps* muscle of MSTN-null mice and their control littermates. The originality of this work was to combine two genomic approaches, namely transcriptomics and proteomics, providing complementary data.

## Results

### *Transcriptomic profiles in myostatin-null mice muscle*

To search for novel candidate MSTN targets, we used oligonucleotide microarrays (human and murine oligonucleotide sequences) of 6,473 genes expressed in muscle. We examined mRNA expression in individual samples from 4 constitutive MSTN-null and 4 control littermates. A reference sample allowing hybridization with detection of 57 to 68% reliable spots was used to compare the patterns of muscle gene expression between groups of mice. The hybridization results showed that, among 6,473 genes represented on the chip, an average of 2,496 (39%) gave valid expression values. Significance analysis of microarray (SAM) was conducted to detect statistically significant expression changes. In total, SAM analysis revealed the differential expression of 192 up- and 245 down-regulated genes (FDR <5%, see additional files 1 and 2).

Bioinformatic analysis indicated that genes belonging to the Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway, insulin/IGF pathway protein kinase  $\beta$  signalling, carbohydrate metabolism, cell differentiation were up-regulated (Table 1). Conversely, genes belonging to the canonical Wnt signalling pathway, calcium signalling pathway and cytokine-cytokine receptor interaction were down-regulated (Table 1). Twenty-three of the differentially expressed genes encoded for transcription factors of which 8 were up-regulated (e.g. *foxa3*) and 15 were down-regulated (e.g. *Lef1*).

**Table 1: Distribution of differential genes in myostatin-null mice vs control mice according to KEGG pathways.**

#Entity KEGG	Down regulated genes	N =	Up regulated genes	N =	Unadj. P value	Adj. P value
<b>Phosphatidylinositol signaling system</b>	No genes	0	Inpp1l, PIK3R3, PIK3CG, PLCG1			
<b>Insulin signaling pathway</b>	Gsk3b	1	Ppp1cb, PTPRF, PIK3R3, PIK3CG, PRKAR1B	5	1.05E-01	
<b>mTOR signaling pathway</b>	No genes	0	MO25, PIK3R3, PIK3CG	3	1.09E-01	
<b>Chronic myeloid leukemia</b>	No genes	0	PIK3R3, PIK3CG, Abl1	3	1.09E-01	
<b>T cell receptor signaling pathway</b>	No genes	0	PIK3R3, PIK3CG, PLCG1	3	1.09E-01	
<b>Fructose and mannose metabolism</b>	Akr1e1, PMM2, Khk, OGT	4	No genes	0	1.19E-01	
<b>ECM-receptor interaction</b>	LAMC3, Col4a2, COL6A1, ITGB8, ITGA9	5	Col4a4	1	2.08E-01	
<b>Calcium signaling pathway</b>	PDE1B, Camk2a, CAMK4, Cacna1i, HTR2A, ADORA2A	6	PLCG1, Ptgfr	2	2.74E-01	
<b>Regulation of actin cytoskeleton</b>	Limk1, ARPC4, ITGB8, ITGA9	4	FGF6, Ppp1cb, PIK3R3, PIK3CG, CFL2, Actb, MYL1	7	3.50E-01	
<b>MAPK signaling pathway</b>	Cacna1i	1	MAP2K7, FGF6, PLA2G6	3	3.51E-01	
<b>Natural killer cell mediated cytotoxicity</b>	KLRC2	1	PIK3R3, PIK3CG, PLCG1	3	3.51E-01	
<b>Apoptosis</b>	Atm	1	PIK3R3, PIK3CG, PRKAR1B	3	3.51E-01	
<b>Wnt signaling pathway</b>	Gsk3b, LRP5, Camk2a, LEF1	4	CCND3	1	3.65E-01	
<b>Leukocyte transendothelial migration</b>	Cxcl15, Cxcl13	2	PIK3R3, PIK3CG, Actb, PLCG1	4	4.27E-01	
<b>Cytokine-cytokine receptor interaction</b>	IL23A, Cxcl15, CXCR3, IL17, Cxcl13	5	CCL22, CCR7	2	4.40E-01	
<b>Toll-like receptor signaling pathway</b>	Irf3	1	PIK3R3, PIK3CG	2	6.09E-01	
<b>B cell receptor signaling pathway</b>	Gsk3b	1	PIK3R3, PIK3CG	2	6.09E-01	
<b>GnRH signaling pathway</b>	Camk2a	1	MAP2K7, PLA2G6	2	6.09E-01	
<b>Axon guidance</b>	Limk1, Gsk3b, Epha2	3	SEMA3A, Abl1, CFL2, EFNA4	4	7.10E-01	
<b>Focal adhesion</b>	LAMC3, Gsk3b, Col4a2, COL6A1, ITGB8, ITGA9	6	CCND3, Ppp1cb, PIK3R3, PIK3CG, Actb, Col4a4	6		
<b>Hedgehog signaling pathway</b>	Gsk3b	1	Gas1	1		
<b>Alzheimer's disease</b>	Gsk3b, Apoe	2	LRP1	1		

N: Number of genes involved in each biological process; Unadj. P value: Unadjusted P value, P value from Fisher's exact test without adjusting for multiple comparisons; Adj. P value: adjusted P value, after correction for multiple testing.

Expression of upstream components of the PI3K survival pathway (Akt, GSK-3β) were surveyed. The steady-state level of Akt mRNA (Table 1) and phosphorylated protein (Table 2) were increased in the muscles of *MSTN*-null mice. Differential expression of the GSK-3β was confirmed by qPCR and western-blot (Table 2) analyses. In addition, the ratio of serine-9 phosphorylated GSK-3β/GSK-3β ration was increased, which illustrates GSK-3β activation in *MSTN*-null versus wild-type skeletal muscle (Table 2).

**Proteomic profiles in myostatin-null mice muscle**

We have used two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, high-throughput image analysis and candidate picking, coupled with mass spectrophotometry to investigate the proteome profile of *MSTN*-null mice vs

control littermates. Comparison of the protein profiles using SAM (FDR <5%) revealed the differential abundance of 38 protein spots (20 up-regulated and 18 down-regulated) in *MSTN*-null mice vs wild-type controls. Mass spectrometry analyses allowed the identification of the candidate spots (Table 3). Differential expression was confirmed for some selected proteins by western-blot analysis (Table 2).

Bioinformatic analysis indicated that most of the differential proteins were related to muscle energy metabolism. Enzymes of the citrate cycle (e.g. pyruvate dehydrogenase lipoamide, dihydrolipoamide S-acetyl transferase E2, isocitrate dehydrogenase, Succinate dehydrogenase) and the respiratory chain (e.g. ATP synthase F1 beta, ATP synthase D chain, ubiquinol cytochrome c reductase core protein 1,



**Table 2: Differential expression of myostatin targets genes confirmed by qPCR and by western-blot experiments in MSTN-null mice vs their control littermates.**

	Proteomics	Transcriptomics	qPCR	Western-Blot
<b>H-FABP</b>	-2.1			-9.1
<b>MYBPH</b>	3.1			1.4
<b>MyHCII</b>				4.9
<b>Syntrophin A</b>	1.5			2.8
<b>p-Akt</b>				2.2
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>		-1.9	-2.4	
<b>GSK-3<math>\beta</math>(ser9)/GSK-3<math>\beta</math></b>				1.7 t
<b>PI3KR3</b>		1.1	1.8	
<b>DJ-1</b>	1.5		1.7	2.2
<b>PINK1</b>		1.9		3.4
<b>PTEN</b>			-1.6 t	-1.6
<b>Mortalin</b>	-1.5		-1.4	-2.1
<b>TCTP</b>	2.7			1.6
<b>14-3-3E</b>	1.8		1.4	1.7
<b>mfgf6</b>			1.9	

Results are expressed as Fold Changes and all the differences have been declared significant ( $P < 0.05$ ) except for some tendencies (t:  $P < 0.10$ ). H-FABP: Heart-Fatty acid binding protein H; MyBP-H: Myosin binding protein H; MyHCII: fast myosin heavy chain isoform; pAkt: phosphorylated Akt; GSK-3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; GSK-3 $\beta$  (ser9): Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (phosphorylated at serine 9); PI3KR3: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit; DJ-1: cancer- and Parkinson's disease-associated protein (park7); PINK1: PTEN-induced putative kinase 1; PTEN: tumour-suppressor phosphatase with tensin homology. TCTP: Translationally controlled tumor protein; 14-3-3E: 14-3-3 $\epsilon$  protein; mfgf6: murine Fibroblast growth factor 6.

NADH-ubiquinone oxidoreductase), and the heart-fatty acid binding protein (H-FABP) were down-regulated (Table 2; Table 3). Conversely two fragments of Glycogen phosphorylase, and enolase 1 (an enzyme of the glycolysis/gluconeogenesis pathway) were up-regulated (Table 3). Abundance levels of Guanidinoacetate methyltransferase, which catalyzes the last step of creatine biosynthesis, purine nucleoside phosphorylase, which catalyzes the reversible cleavage of inosine and guanosine to their respective bases hypoxanthine and guanine, and the adenylate kinase 1, which is an important enzyme in cellular adenine nucleotide homeostasis, were also increased. Myosin-binding protein H, which is a protein involved in the contractile apparatus, was revealed to be up-regulated in *MSTN*-null mice vs wild-type controls and this was confirmed by western-blot analysis (Table 2). Fast glycolytic Myosin Heavy chain isoforms (MyHCII) were also more abundant in *MSTN*-null mice vs wild-type controls in western-blot experiments (Table 2).  $\alpha$ 1-Syntrophin was found to be up-regulated in *MSTN*-null mice (Table 2; Table 3). All together, these data are representative of greater fast glycolytic metabolism in the muscle of *MSTN*-null mice.

A differential abundance of survival/mortality factors and some chaperones (Table 3) was also detected with the down regulation of Hsp alpha crystallin-related B6, Hsp

9A (mortalin), and the up-regulation of Tcp1, TCTP, DJ-1, and 14-3-3E. The differential abundance levels were confirmed by western-blot analyses for mortalin, DJ-1, TCTP and 14-3-3E (Table 2 and Figure 1). All together these data indicate that *myostatin* inactivation was associated with up-regulation of survival/anti-apoptotic factors, in favour to increased cell survival.

## Discussion

In this study, we have looked for novel myostatin targets and mechanisms involved in the control of muscle homeostasis. For this, we have used a functional genomics strategy, which combined both transcriptomic and proteomic profiling of *MSTN*-null vs wild-type control skeletal muscle. We hypothesized that examination of molecular profiles in the muscles of young growing mice in the context of *MSTN* loss-of-function would allow the identification of myostatin downstream targets. However any changes in gene and protein expression may also reflect consequences of loss of *MSTN* function. Anyway, this approach should give information on direct or indirect *MSTN* targets by revealing altered physiological pathways. A similar percentage of genes (17.5%) and proteins (15.3%) were declared to be differentially expressed with both techniques as indicated by the ratio of the number of differential genes and proteins to the total number of genes spotted on chips and proteins detected in 2-DE gels in the

**Table 3: Differentially expressed muscle proteins in myostatin-null mice vs control mice.**

Spot no.	Protein name	Relevant Swiss Prot Accession number	pI	Mr (kDa)	FC
1781	Eef1g protein [Mus musculus]	Q8R1N8_MOUSE	7.02	37.178	Increased 2.8
1735	Adenylate kinase I [Mus musculus]	KAD1_MOUSE	5.67	21.64	Increased 1.5
1728	DJ-1 protein [Mus musculus]	PARK7_MOUSE	6.32	20.236	Increased 1.5
1690	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3 [Mus musculus]	NDUS3_MOUSE	6.67	30.302	Increased 1.7
1690	Guanidinoacetate methyltransferase [Mus musculus]	GAMT_MOUSE	5.43	26.604	Increased 1.7
1663	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta isoform a [Mus musculus]	A2AMV4_MOUSE	5.47	31.611	Increased 1.4
1593	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2 [Mus musculus]	Q3UBZ3_MOUSE	5.57	33.118	Increased 1.4
1673	Muscle glycogen phosphorylase [Mus musculus]	PYGM_MOUSE	6.65	97.681	Increased 2.4
1894	Glycogen phosphorylase, muscle form (EC 2.4.1.1) (Myophosphorylase) [Mus musculus]	PYGM_MOUSE	6.65	97.094	Increased 1.7
1393	Enolase 1, alpha non-neuron [Mus musculus]	ENOA_MOUSE	6.37	47.453	Increased 1.3
1230	t-complex protein 1 [Mus musculus]	TCPA1_MOUSE	5.82	60.867	Increased 1.7
1164	Myosin binding protein H [Mus musculus]	MYBPH_MOUSE	6.21	53.065	Increased 3.1
1166	Myosin binding protein H [Mus musculus]	MYBPH_MOUSE	6.09	53.065	Increased 1.5
1731	Translationally-controlled tumor protein (TCTP) (p23) (21 kDa polypeptide) (p21) [Mus musculus]	TCTP_MOUSE	4.76	19.45	Increased 2.7
1703	I4-3-3 protein epsilon (I4-3-3E) [Mus musculus]	I433E_MOUSE	4.63	29.155	Increased 1.8
1706	Calpain small subunit 1 (CSS1) (Calcium-dependent protease small subunit 1) [Mus musculus]	CPNS1_MOUSE	5.41	28.445	Increased 1.4
1718	Proteasome subunit beta type 4 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome beta chain) [Mus musculus]	PSB4_MOUSE	5.47	29.097	Increased 1.4
1980	Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1) (Inosine phosphorylase) (PNP) [Mus musculus]	PNPH_MOUSE	5.78	32.256	Increased 2.9
1427	Alpha-1-syntrophin [Mus musculus]	SNTA1_MOUSE	6.4	53.632	Increased 1.5
1804	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart [Mus musculus]	FABPH_MOUSE	5.75	14.81	Decreased 2.1
1803	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart [Mus musculus]	FABPH_MOUSE	6.11	14.81	Decreased 2.1
1764	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6 [Mus musculus]	HSPB6_MOUSE	5.64	17.567	Decreased 1.8
1620	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta [Mus musculus]	ODPB_MOUSE	6.41	39.254	Decreased 1.4
1571	Lactate dehydrogenase 2, B chain [Mus musculus]	LDHB_MOUSE	5.7	36.834	Decreased 2.4
1541	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha [Mus musculus]	IDH3A_MOUSE	6.27	40.069	Decreased 1.3
1534	Isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha [Mus musculus]	IDH3A_MOUSE	6.27	40.069	Decreased 1.6
1407	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 [Mus musculus]	QCRI_MOUSE	5.81	53.446	Decreased 1.3
1373	ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit [Mus musculus]	AT5F1_MOUSE	5.19	56.265	Decreased 2.3
1178	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex) [Mus musculus]	ODP2_MOUSE	8.81	68.473	Decreased 1.5
1084	Heat shock protein 9A [Mus musculus]	GRP75_MOUSE	5.91	73.768	Decreased 1.5
1691	NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit, mitochondrial precursor [Mus musculus]	NUGM_MOUSE	6.4	30.189	Decreased 1.3
1139	Serum albumin precursor [Mus musculus]	ALBU_MOUSE	5.75	68.648	Decreased 1.3
1109	Serum albumin precursor [Mus musculus]	ALBU_MOUSE	5.75	68.648	Decreased 1.6

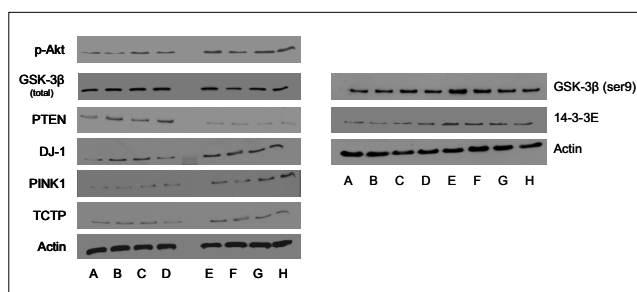
**Table 3: Differentially expressed muscle proteins in myostatin-null mice vs control mice. (Continued)**

1739	<b>ATP synthase D chain, mitochondrial [Mus musculus]</b>	ATP5H_MOUSE	5.52	18.607	Decreased 1.3
1152	<b>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial precursor [Mus musculus]</b>	DHSA_MOUSE	7.06	72.539	Decreased 1.7
1400	<b>Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein I, mitochondrial precursor [Mus musculus]</b>	UQCRI_MOUSE	5.75	52.735	Decreased 1.5
1608	<b>Troponin T, fast skeletal muscle (TnTf) (Fast skeletal muscle troponin T) (fTnT) [Mus musculus]</b>	TNNT3_MOUSE	5.26	32.09	Decreased 1.6

Accession number: reference of each protein in Swiss-Prot database; pI: isoelectric point; Mr (kDa): molecular weight; FC: Fold-Change

range of pH 4–7, respectively. Transcriptomics and proteomics provided complementary data and led us to analyse both gene expression by qPCR and protein abundance by western blotting for some candidate targets.

As expected, the expression of several genes and abundance of proteins involved in muscle energy metabolism were altered. Specifically we found an up-regulation of those involved in glycolytic metabolism and a down-regulation of mitochondrial proteins. Similar to previously published results [27-29], this provided additional evidence of a glycolytic shift within skeletal muscle in absence of functional myostatin. Additionally, expression level of  $\alpha$ 1-syntrophin, a predominant syntrophin isoform in skeletal and cardiac muscle, significantly increased in *MSTN*-null mice. This result is in agreement with the work of Vandebrouck and co-workers [30], which indicates that  $\alpha$ 1-syntrophin might play a potential signalling role in the regulation of calcium influx in muscle cells and thereby regulate muscle activity.



**Figure 1**  
**Abundance of candidate proteins to be myostatin targets as revealed by western-blotting in the muscles of control and *MSTN*-null mice.** A-D: control mice; E-H: *MSTN*-null mice. pAkt: phosphorylated akt; GSK-3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; GSK-3 $\beta$  (ser9): Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (phosphorylated at serine 9); DJ-1: cancer- and Parkinson's disease-associated protein (park7); PINK1: PTEN-induced putative kinase 1; PTEN: tumour-suppressor phosphatase with tensin homology. TCTP: Translationally controlled tumor protein; 14-3-3E: 14-3-3 $\epsilon$  protein. Actin was used as a loading control protein.

### Increased potential for PI3K pathway

Our study revealed that upstream components of the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$ , a signalling network that promotes cell survival and proliferation, were targets of myostatin inactivation. The core of the PI3K signalling pathway begins with PI3K activation and subsequent generation of the second messenger lipid phosphatidyl (3,4,5) triphosphate, which recruits and activates PI-dependent kinase. The latter phosphorylates and activates protein kinase B/Akt [31]. GSK-3 $\beta$  is a substrate for phosphorylated Akt and is inactivated upon phosphorylation. We detected the differential expression of mRNAs that encode for PIK3R3, PIK3CG, PLCG1, and GSK-3 $\beta$ . Increases in the abundance of phosphorylated-Akt and in the activation ratio of GSK-3 $\beta$  (phosphorylated GSK-3 $\beta$  at serine 9/GSK-3 $\beta$ ) were also detected (Table 2). This finding is original since the PI3K pathway is mainly regulated through post-translational modification namely phosphorylation. Thus, our results indicate that myostatin inactivation resulted in increased potential for PI3K/Akt activation and decreased potential for GSK-3 $\beta$  activity both at the transcriptional and post-translational levels.

Interestingly, we also detected the differential abundance of factors regulating the PI3K pathway e.g. DJ-1, PTEN and PINK1. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein also called park7, protects cells from toxic stresses and is implicated in mitochondria and oxidative stress-related survival pathways (reviewed in [32]). It associates with chaperones including mortalin. DJ-1 has also been reported to be a novel regulator of the PI3K-PTEN pathway [33]. The tumour-suppressor phosphatase with tensin homology (PTEN) is the most important negative regulator of the cell-survival signalling initiated by PI3K (Figure 1). DJ-1 interacts with PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), which encodes a Ser/Thr kinase with a mitochondrial-targeting signal, and collaborate to protect cells against oxidative stress induced cell death [34]. Interestingly, our data show up-regulation of DJ-1 and PINK1 and down-regulation of PTEN both at the transcriptional and protein levels and this could account for activation of the PI3K pathway in *MSTN*-null mice.

The PI3K/Akt pathway plays a pivotal role in the promotion of cell proliferation and inhibition of cell death. It plays an important role in at least two signal transducing systems, namely, the Wnt/wingless and PI3K pathways, which influence proliferation and cell survival, respectively. Our data agree well with data that demonstrate a correlation between activation of PI3K pathway and increase in cell size [35] and the activation of Akt, which stimulates muscle hypertrophy and antagonizes the loss of muscle protein [36]. Akt signalling through GSK-3 $\beta$ , mTOR (a PI3K-related kinase) and Foxo1 was shown to be associated with skeletal muscle hypertrophy and atrophy processes in humans [37]. Recently, Amirouche and workers have shown that MSTN negatively regulates Akt/mTOR signalling pathway [38]. It was also shown that MSTN activates GSK-3 $\beta$  and decreases cyclin D1 by inhibiting the PI3K/Akt pathway and this has been proposed to be involved in the progression of muscle-disuse atrophy [39]. Lastly, the PI3K/Akt pathway is the major intracellular pathway activated by IGF-I stimulation during myogenesis [40]. A primary effect of GSK-3 $\beta$  inhibition in muscle is to promote myogenic differentiation and it has been proposed that IGF-mediated hypertrophy involves the negative regulation of GSK-3 $\beta$  activity [41].

#### **Altered expression/abundance of factors involved in cell survival/apoptosis**

Our data revealed changes in the expression of genes and proteins related to cell survival/apoptosis pathways. Actually, we detected the down-regulation of some factors (e.g. alpha crystallin-related B6, heat shock protein 9A) and up-regulation of others (e.g. Dad1, survivin, TCTP, 14-3-3E) that may be a signature of increased cell survival and anti-apoptotic processes. Indeed, alpha crystallin-related B6, a heat shock protein 20, is thought to protect cells from apoptosis [42]. Heat shock protein 9A (Mortalin, Grp75), a member of the heat shock protein 70 family, plays a central role in mitochondrial import, energy generation and chaperoning of mis-folded proteins (for review [43]). This factor interacts with the tumor suppressor protein p53 and inactivates its transcriptional activation and apoptotic functions [44]. Up-regulation of mortalin contributes significantly to tumorigenesis [45]. Dad1 (defender against apoptotic death) has been reported to be a programmed cell death suppressor necessary for cell survival in a mammalian cell line [46] and the loss of Dad1 protein triggers apoptosis [47]. Survivin (Birc5) is a member of the inhibitor of apoptosis (IAP) family that prevents apoptotic cell death in various cell types including hematopoietic, endothelial, embryonic and neuronal cells [48]. Translationally controlled tumor protein (TCTP) is involved in the calcium binding and microtubule stabilization [49] and has been implicated in cell growth, cell cycle progression, malignant transformation and in protection of cells against various stress condi-

tions and apoptosis [50]. 14-3-3E is a member of the 14-3-3 family of phosphoserine-binding adapter molecules that mediate a general survival-promoting function through interaction with target proteins, by enhancing pro-survival signalling while suppressing activity of pro-apoptotic proteins (reviewed by [51]). They are involved in the regulation of apoptosis through multiple interactions with proteins of the core mitochondrial machinery, pro-apoptotic transcription factors and their upstream signalling pathways. One prominent mechanism for the suppression of apoptosis is through 14-3-3-mediated sequestration of pro-apoptotic proteins (e.g. BAD, Bcl-2-antagonist of cell death; [52]). Furthermore, 14-3-3 proteins regulate the Akt/mTOR pathway via interaction with PRAS40, a mTOR binding partner [53]. In our study, 14-3-3E showed greater expression in the hypertrophied muscles of MSTN-null mice. Interestingly, some of the differential proteins detected in our study (e.g. DJ-1, T-complex protein 1, proteasome B chain) were reported to belong to the 14-3-3 interacting "phosphoproteome" [54].

Interestingly, in a previous study conducted in the context of MSTN loss of function in cattle [28], we have already found an up-regulation of genes encoding proteins involved in apoptosis (e.g. DDX, PDCD6) and a down-regulation of anti-apoptotic genes belonging to the Bcl2 family. Supporting the hypothesis of decreased apoptosis in the muscles of MSTN-null mice, we found that the bioactive fragment of the initiator Caspase 8 was decreased in these mice compared to their littermates (data not shown). The functional significance of proteins related to cell survival/apoptosis to muscle hypertrophy remains to be further studied. However, the results of the present study suggest that MSTN may behave as an arbiter of the survival decision in the muscles. In MSTN-null mice, increased abundance of anti-apoptotic factors probably induces a by-pass of apoptosis and consequently increased cell survival, a process leading to hypertrophy (Figure 1). The involvement of MSTN in apoptosis remains scarce and controversial. There are conflicting results regarding MSTN and apoptosis. It is not clear whether this factor protects myoblasts from apoptosis [14,55] or promotes the apoptotic process [39,56]. This discrepancy may be explained by the different experimental conditions in which MSTN effect was examined *in vitro* (e.g. proliferation *vs* differentiation phase, myogenic cell lines *vs* primary myoblast cultures). Although skeletal muscle is considered to be rather resistant to apoptosis partly due to high concentration of endogenous inhibitors (reviewed in [57]), there is evidence that apoptotic events occur in skeletal muscle under physiological (exercise) and pathological conditions (e.g. muscle disuse-induced atrophy, denervation, ageing, dystrophinopathies) and may contribute to atrophy and loss of fibers

[58-61]. "Myonuclear apoptosis" is a predominant form of apoptosis by which a loss of myonuclei occurs without cell death during muscle atrophy [62,63]. This process may have major consequence since (1) the number of myonuclei is a critical determinant for protein synthesis capacity (2) apoptosis within muscle may alter the myonuclear to cytosolic ratio (protein/DNA). Thus, modulation of myonuclear number or myonuclear domain size or both is a mechanism by which MSTN may contribute to muscle homeostasis. Inhibition of apoptosis in the context of MSTN loss-of-function could lead to increased myonuclear survival and consequently to increased protein biosynthesis. Thus, this could contribute to the hypertrophic pathway, especially in growing mice. Work is in progress to assay apoptotic process in muscles according to MSTN activity.

### Conclusion

In conclusion, integration of transcriptomic and proteomic data indicate that MSTN inactivation could promote survival and resistance to apoptosis in muscle through the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  survival pathway and through a mechanism that involves regulation of pro- and anti-apoptotic factors. A combination of increased potential for PI3K activation and decreased myonuclear apoptosis could be crucial to muscle hypertrophy in MSTN-null mice (Figure 2).

### Methods

#### Muscle samples

The MSTN-null mice have a constitutive invalidation of *myostatin* gene [7]. These mice were bred at the Iowa State University, were slaughtered at 5 weeks postnatally, were dissected and their muscle masses were weighted. At this age the mice were nearly adults and this developmental stage was chosen in order to dissociate the influence of MSTN on hypertrophy from that of myofiber hyperplasia. Muscle samples were taken from *Quadriceps* muscle (mixed slow oxidative) immediately after slaughter, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until protein extraction was performed. The *Quadriceps* muscle was chosen for the genomic experiments owing to its weight and marked hypertrophy (+87%, data not shown).

#### Microarray experiments

Transcriptomic analysis was performed with a microarray of 6,473 genes expressed in muscle ("Myochips" available from OUEST-genopole®, France) as described in [28]. These Myochips consisted in 6,473 oligonucleotides from human (76%) and murine (24%) origin and 919 controls. Microarray experiments were performed according to recently proposed standards (MIAME consortium). Data were incorporated into the BASE database and the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) [http://](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/) and are accessible through GEO Series GSE5561 and GSE5456.

Total RNA was extracted from muscle tissue samples with TRIZOL® reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendation. The RNA was then purified and treated with DNase using the RNeasy® Mini kit (Qiagen, France). RNA integrity was checked using Lab Chip Agilent technology, as previously described [28]. Each individual sample was compared to a reference pool consisting of skeletal muscle transcripts isolated from different muscles of four mice lines (Balb, C57bl6, B129) of different age and gender, and from cultured murine myogenic cells (C2C12).

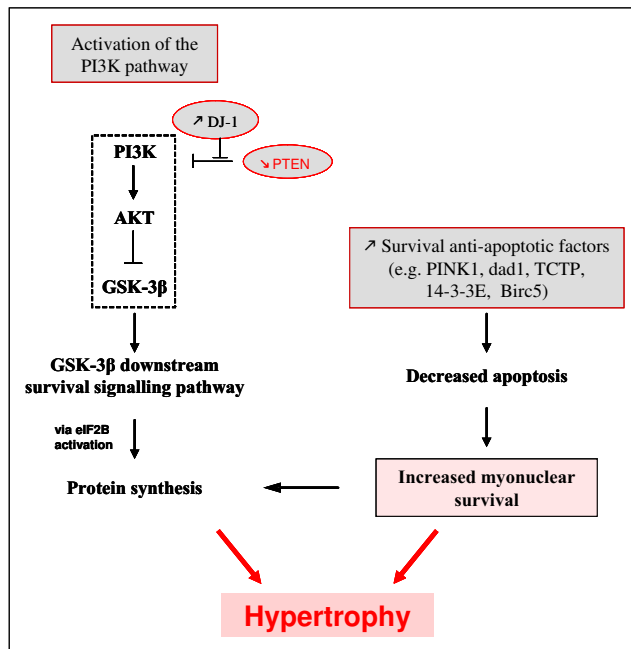
Labeling was performed using a "Pronto Plus Direct Systems" kit (Corning-Promega) according to the supplier's guidelines. Five  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed into cDNA in the presence of cyanine (Cy3-dCTP/Cy5-dCTP, Amersham). cDNA purification was performed according to the manufacturer's instructions, and concentration and frequency of incorporation were determined by spectrophotometry. Three chips were hybridized per sample comparison. After washing, the chips were scanned on an Affymetrix 428™ Array Scanner. Images were analyzed using GenePix Pro V6 software (Axon instrument, Inc). Raw intensity data were normalized using the MADSCAN program (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/>, 15). In order to identify differentially expressed genes, the Cy3/Cy5 ratios were statistically analyzed using Significance Analysis of Microarrays (SAM) method (FDR <5%; [64]). With the available sample size (4 animals per group) and 3 repeated measurements per sample and taking account a test power (1- $\beta$ ) set at 80% [65,66] and the biological variability (Standard Deviation SD = 0.083), the minimum difference was 11% corresponding to a threshold fold-change (FC) of 1.11. Thus we only retained appropriately powered genes.

#### Proteomics

##### Preparation of muscle samples for 2-DE

Sample preparation was performed according to Bouley *et al.* [67]. Briefly, frozen muscle tissue (50–100 mg) was homogenized in a lysis buffer containing 8.3 M urea, 2 M thiourea, 1% DTT, 2% CHAPS and 2% IPG buffer pH 3–10 with a polytron and centrifuged at 10,000 g for 30 min. The supernatant was harvested and protein concentration for each sample was determined as described in the PlusOne 2-DE Quant kit (Amersham Biosciences).

Protein quantification was determined using the 2-DE Quant kit (Amersham Uppsala, Sweden), with bovine serum albumin as a standard. Average amount of protein was 9.6  $\mu$ g.  $\mu$ l<sup>-1</sup>  $\pm$  1.48  $\mu$ g.  $\mu$ l<sup>-1</sup>.



**Figure 2**  
**In MSTN-null mice, regulators of the PI3K pathway and cell survival/apoptosis likely contribute to muscle hypertrophy.** *PI3K signalling pathway:* PI3K, Phosphatidylinositol 3 Kinase; Akt, protein kinase B; GSK-3β, Glycogen synthase kinase 3β; eIF2B, eukaryotic protein synthesis initiation factor 2B; PTEN, tumour-suppressor phosphatase with tensin homology (the most important negative regulator of the cell survival signalling initiated by PI3K); DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein (a novel regulator of the PI3K-PTEN pathway). *Survival/Anti-apoptotic factors:* PINK1, PTEN-induced putative kinase; Dad1, defender against apoptotic death; TCTP, Translationally controlled tumour protein; 14-3-3E, 14-3-3 protein epsilon; Birc5, survivin.

#### 2-DE separation

2-DE separation was performed according to the method of Bouley *et al.* [67]. Briefly, for the first dimension (IEF), proteins were solubilized in a rehydration solution (8 M urea, 1 M thiourea, 0.28% DTT, 2% CHAPS, 2% IPG buffer pH 4–7 and 0.01% CBBR-250). IPG strips, 18 cm, covering a pH range of 4–7 were rehydrated overnight in 330 ml of this protein solution under low viscosity paraffin oil (sample loading by rehydration). IPG strips containing 700 μg of proteins were subjected to IEF (73.5 kVh) in a Multiphor II gel apparatus at 20.5°C. After completion of the IEF, proteins on the strip were equilibrated for 15 min in a buffer containing 6 M urea, 1% DTT, 30% glycerol, 50 mM Tris base, 2% sodium dodecyl sulphate (SDS), and DTT and then for an additional 15 min in the same solution except that DTT was replaced by 5% iodoacetamide and 0.002% bromophenol blue was added. The

IPG strips were then transferred onto 11% T, 2.6% C separating polyacrylamide gels, and proteins were separated in the second dimension using a Hoefer DALTSix system (Hoefer, Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA). 2-DE gels were stained using a colloidal CBB G-250 procedure [67] and digitized on a calibrated scanner (ImageScanner, Amersham).

#### Image and Data analysis

ImageMaster 2D Platinum software (Amersham Biosciences) was used to match and quantify protein spots on 2-DE gels. Parameters used for spot detection were minimal area = 70 pixels, smooth factor = 2.0, and saliency = 20. An artificial reference gel was created combining all the spots present in the different gels. The reference gel was then used for matching of corresponding protein spots between gels. The volume of individual spot was normalized (% volume) according to the mean volume of 249 protein spots which were strictly common to all gels. Comparisons between groups were performed using SAM statistical test [68]. Differences were declared significant for FDR <5%. Taking into account the biological variability which is 21%, the power analysis [66] allowed retaining proteins which present a minimum difference of 41% corresponding to a threshold FC of 1.41.

#### Identification of spots by Mass Spectrometry

All differential protein spots were excised from the polyacrylamide gel and placed in a Multiscreen solvint 96-well filtration system plate (Millipore Corp., Bedford, MA). These proteins of interest were digested proteolytically in the plate with 3 volumes of trypsin solution (10 ng/μL; V5111, Promega, Madison, WI) at 37°C for 5 h and extracted with 8–12 μL of ACN. The resulting peptide fragments were mixed with an equal volume of CHCA saturated solution in 0.1% TFA, 50% aqueous ACN.

Peptide mass fingerprintings (PMF) of tryptic peptides were identified in a positive reflectron mode using a voyager DE Pro MALDI-TOF (Perspective Biosystem, Farmingham, MA, USA). External calibration was performed with a standard peptide solution (Proteomix, LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). Internal calibration was performed using peptides resulting from auto-digestion of porcine trypsin, with protonated masses of 842.509, 1045.564, and 2211.104 Da. Peptides mass fingerprints were compared with mammalian databases [NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/> and SWISS-PROT <http://www.expasy.org/sprot/>] using MASCOT and ProFound software [<http://www.matrixscience.com> and <http://prowl.rockefeller.edu>, respectively (June 2007 and October 2007)].

The search criteria used were 1 missing trypsin cleavage site, partial methionine oxidation, partial carbamid-

**Table 4: Primer sequences used in quantitative real-time PCR.**

Gene Symbol	Forward primer	Reverse primer
DJ-1	AACACACCCACTGGCTAAGG	GGGCTTGGGCTCTAGTCTTT
Ywhae	GAGGTGTTTTGGGGGAGTTT	GGCTTCCATACCACCTTCAA
HSPA9	GCCGTTTCCAGTGAACAAG	GATGCTGCCGTCTGATGTT
GSK-3 $\beta$	CTCTGGCCACCATCCTTATC	GTTCCAGGTGGAGTTGGAAGC
PTEN	TGCAGAAAGACTTGAAGGTG	ATAAGTTCTAGCTGTGGTGG
Pi3Kr3	ATGAGAACCTGCCGCATTAT	GAATGCACCATCTGGTTTCC
mfgf6	ATTGGGAAAGCGGCTATTTGC	CTCGTGTGTTCCACTGATGC
mS6R	TTTGATTCTGAAAGCCATGCG	CGGTCCATCAGGATTCTATTG

All primer sequences were designed with the Primer3 software.

DJ-1: cancer- and Parkinson's disease-associated protein (park7); 14-3-3E: 14-3-3 $\epsilon$  protein; HSPA9: mortalin, GSK-3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; PI3KR3: Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit; PTEN: tumour-suppressor phosphatase with tensin homology; mfgf6: murine Fibroblast growth factor 6; mS6R: mouse ribosomal protein S6.

omethylation of cysteine and mass deviation lower than 30 ppm. We required at least 5 matched peptides per protein for identification and used the ProFound and MAS-COT probabilistic score and the accuracy of the experimental-to-theoretical isoelectric point (pI) and molecular weight (Mr).

#### Bioinformatic tools

To understand biological function or molecular mechanism of the main molecular targets of MSTN, we used a set of bioinformatics web tools such as Genomatix, DAVID and PANTHER for gene identification and String for interactions networks between proteins. The data mining allowed to visualize KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway and to classify gene and protein by their function.

#### Validation of Proteins and genes expression

##### Western blotting

Western-blotting was used to validate the main differentially expressed proteins. These proteins were separated by gel electrophoresis using SDS-PAGE for 2 h. After migration, the proteins were transferred onto PVDF transfer membrane Millipore (Dutscher Dominique SAS, France). Membranes were then blocked with 5% non-fat milk in T-TBS 1 $\times$  buffer containing (blocking solution) and incubated under gentle agitation all the night at room temperature in the presence of the a primary antibodies: DJ-1, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-DJ-1 antibody (sc 32874, Santa Cruz); MyBP, 1:4000 dilution of purified mouse monoclonal anti-MyBP antibody (H0000 4608-MO1, ABNOVA); TCTP, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-HRF antibody (sc 30124, Santa Cruz); 14-3-3 $\epsilon$ , 1:4000 dilution of purified goat polyclonal anti-14-3-3 $\epsilon$  protein antibody (sc 1615, Santa Cruz);  $\alpha$ -1 syntrophin, 1:500 dilution of purified rabbit polyclonal anti-SNTA1 antibody (sc- 50460, Santa Cruz); H-FABP, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-H-FABP, was a gift from Dr. Jacques Veerkamp and

Dr. Herman Van Moerkerk (Dept. Biochemistry, Nijmegen, Netherlands) [63]; mortalin, 1:250 dilution of purified mouse monoclonal anti-GRP75 antibody (MAB3584, Clone 419612, R&D systems); PINK1, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-PINK1 antibody (sc- 33796, Santa Cruz); GSK-3 $\beta$ , 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-GSK-3 $\beta$  antibody (sc-9166, Santa Cruz); GSK-3 $\beta$  (ser9), 1:4000 dilution of purified goat polyclonal anti-p-GSK-3 $\beta$  (Ser9) antibody (sc- 11757, Santa Cruz); MyHC, 1:2000 dilution of purified mouse monoclonal anti-MyHC antibody [S5 8H2, lot: 9013-1, obtained under "Noé" project who associates our team and Biocytex company [69] and now this antibody is commercialized by Agro-Bio society]; PTEN, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-PTEN antibody (sc- 9145, Santa Cruz); p-Akt, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-p-Akt 1/2/3 (Ser473) antibody (sc- 33437-R, Santa Cruz); Actin, 1:20000 dilution of purified mouse monoclonal anti-actin antibody (IgG2a, Clone AC40, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), which are able to bind to its specific protein. The blots were extensively washed with Tris buffer and incubated under gentle agitation with the secondary antibodies (anti-mouse, anti-goat or anti-rabbit IgG combined with conjugated with horseradish peroxidase 1: 20000 dilution) for 1 h. The activity of the enzyme was revealed by Enhanced Chemiluminescence kit (Amersham).

The power analysis [66] allowed retaining proteins which present a minimum difference of 45% corresponding to a threshold FC of 1.45.

##### Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis

Seven genes shown to be differentially expressed were selected from the results obtained by microarray analysis and by proteomic analysis. The quantitative RT-PCR (qPCR) was realized using SYBR Green I dye. PCRs were performed using gene-specific primers pairs (Table 4). The

absolute quantity of each target gene was determined by using serially diluted standards to generate a standard curve. The concentration in pg/ $\mu$ mol of each gene was determined by using a linear relationship between amounts of standards cDNA and their Ct (Cycle threshold). Real-Time PCR experiment was controlled using the ribosomal protein S6 as reference gene. The power analysis [66] allowed retaining genes which present a minimum difference of 54% corresponding to a threshold FC of 1.54.

#### Western-blot and RT-PCR data analysis

The difference of proteins and genes levels between myostatin-null mice and their controls was analyzed by Student t-test. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). A difference between the two groups was considered significant when  $P < 0.05$ .

#### Abbreviations

MSTN: myostatin; SAM: Significance Analysis of Microarrays; DNA: Desoxyribo Nucleic Acid; FC: Fold Change; FDR: False Discovery Rate; PI3K: the Phosphatidyl Inositol 3-kinase.

#### Authors' contributions

IC and ICM carried out the experiments. ICM conceived the experimental design in collaboration with BP and JFH who provided useful advice for data analysis and interpretation. IC and BM were actively involved in data analyses and interpretation. JR bred the experimental animals and provided muscle samples. CC provided the array and skilled advice for microarray analyses. IC and ICM wrote the manuscript. All authors read the manuscript, significantly contributed either to the presentation, the interpretation or the discussion of the results, and were highly involved in writing the manuscript.

#### Additional material

##### Additional file 1

*Up-regulated gene list with fold change (FC). The data provided here represent the statistical analysis (SAM) of up-regulated genes in the muscles of MSTN-null mice.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-196-S1.doc>]

##### Additional file 2

*Down-regulated gene list with fold change (FC). The data provided here represent the statistical analysis (SAM) of down-regulated genes in the muscles of MSTN-null mice.*

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-196-S2.doc>]

#### Acknowledgements

The authors thank members of the U533 Inserm group's (Faculté de Médecine de Nantes France) for providing the Myochips and bioinformatics tools and for skilled technical advice; G Gentès, N Dunoyer and C Barboiron for excellent technical assistance in molecular biology, C Chambon (Plateforme de Theix "Exploration du Métabolisme: des gènes aux métabolites") for protein identification. This work was supported by a grant from the French Muscular Dystrophy Association (AFM).

#### References

1. Guttridge : **Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004, **7(4)**:443-450.
2. Tsuchida K: **Activins, Myostatin and Related TGF-beta Family Members as Novel Therapeutic Targets for Endocrine, Metabolic and Immune Disorders.** *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2004, **4**:157-166.
3. Silience MN: **Technologies for the control of fat and lean deposition in livestock.** *Vet J* 2004, **167(3)**:242-257.
4. Holmes JH, Ashmore CR: **A histochemical study of development of muscle fiber type and size in normal and "double muscled" cattle.** *Growth* 1972, **36**:351-372.
5. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, et al.: **A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle.** *Nat Genet* 1997, **17**:71-74.
6. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA: **A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs.** *PLoS Genetics* 2007, **3(5)**:79.
7. McPherron AC, Lawler AM, Lee S-J: **Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member.** *Nature* 1997, **387(6628)**:83-90.
8. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF, Lee S-J: **Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child.** *N Engl J Med* 2004, **350(26)**:2682-2688.
9. Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R, et al.: **Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene.** *Genesis* 2003, **35(4)**:227-238.
10. 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.
11. Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH Jr, Kull FC Jr, Gonzalez-Cadavid N: **Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, **280(2)**:E221-228.
12. Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J: **Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, **282(5)**:C993-999.
13. Joulia-Ekaza D, Cabello G: **Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiological aspects.** *Exp Cell Res* 2006, **312**:2401-2414.
14. Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G: **Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin.** *Experimental Cell Research* 2003, **286(2)**:263-275.
15. 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)**:1135-1147.
16. McFarland : **The role of myostatin in chicken (Gallus domesticus) myogenic satellite cell proliferation and differentiation.** *Gen Comp Endocrinol* 2007, **151**:351-357.
17. Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM: **Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy.** *Faseb J* 2006, **20(1)**:580-582.
18. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE: **Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading.** *Am J Physiol* 1999, **277(2 pt 2)**:R601-606.



19. Solomon AM, Bouloux PMG: **Modifying muscle mass – the endocrine perspective.** *J Endocrinol* 2006, **191(2)**:349-360.
20. Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ, Gonzalez-Cadavid NF: **Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, **285(4)**:E876-888.
21. Durieux A-C, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Pasdeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D: **Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression.** *Endocrinology* 2007, **148(7)**:3140-3147.
22. Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S, Sunada Y: **Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition.** *J Clin Invest* 2006, **116(11)**:2924-2934.
23. Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM, Thissen JP: **Myostatin Gene Deletion Prevents Glucocorticoid-Induced Muscle Atrophy.** *Endocrinology* 2007, **148(1)**:452-460.
24. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Henneby A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R: **Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism.** *J Cell Physiol* 2006, **209**:501-514.
25. McMahon CD, Popovic L, Oldham JM, Jeanplong F, Smith HK, Kambadur R, Sharma M, Maxwell L, Bass JJ: **Myostatin-deficient mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hindlimb suspension.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003, **285(1)**:E82-87.
26. Hocquette J-F, Bas P, Bauchart D, Vermorel M, Geay Y: **Fat partitioning and biochemical characteristics of fatty tissues in relation to plasma metabolites and hormones in normal and double-muscling young growing bulls.** *Comp Biochem Physiol A Molec Integr Physiol* 1999, **122(1)**:127-138.
27. Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF, Picard B: **Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy.** *Proteomics* 2005, **5(2)**:490-500.
28. Cassar-Malek I, Passelaigne F, Bernard C, Leger J, Hocquette J-F: **Target genes of myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses.** *BMC Genomics* 2007, **8(1)**:63.
29. Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D, Reecy JM: **Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy.** *FASEB J* 2006, **20(3)**:580-582.
30. Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J, Balghi H, Sebille S, Kitzis A, Raymond G, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B: **Regulation of capacitative calcium entries by {alpha}I-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of {alpha}I-syntrophin.** *FASEB J* 2007, **21(2)**:608-617.
31. Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN: **Akt/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: Kinase Activation by Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68(1)**:965-1014.
32. Lev N, Roncevic D, Ickowicz D, Melamed E, Offen D: **Role of DJ-1 in Parkinson's disease.** *J Mol Neurosci* 2006, **29(3)**:215-225.
33. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, et al.: **DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN.** *Cancer Cell* 2005, **7(3)**:263-273.
34. Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia J-h, et al.: **Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease.** *Hum Mol Genet* 2006, **15(11)**:1816-1825.
35. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW: **Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis.** *Nat Rev Cancer* 2006, **6(3)**:184-192.
36. Frost RA, Lang CH: **Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass.** *J Appl Physiol* 2007, **103(1)**:378-387.
37. Leger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Deriaz O, Crettenand A, Gobellet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, et al.: **Akt signalling through GSK-3{beta}, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy.** *J Physiol* 2006, **576(3)**:923-933.
38. Amirouche A, Durieux A-C, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D: **Down-Regulation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Response to Myostatin Overexpression in Skeletal Muscle.** *Endocrinology* 2009, **150(1)**:286-294.
39. Yang W, Zhang Y, Li Y, Wu Z, Zhu D: **Myostatin Induces Cyclin D1 Degradation to Cause Cell Cycle Arrest through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-3beta Pathway and Is Antagonized by Insulin-like Growth Factor I.** *J Biol Chem* 2007, **282(6)**:3799-3808.
40. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ: **The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors.** *Mol Cell* 2004, **14**:395-403.
41. Velden JIJ van der, Langen RCJ, Kelders MCJM, Wouters EFM, Janssen-Heininger YMW, Schols AMWJ: **Inhibition of glycogen synthase kinase-3{beta} activity is sufficient to stimulate myogenic differentiation.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2006, **290(2)**:C453-462.
42. Fan G-C, Chu G, Mitton B, Song Q, Yuan Q, Kranias EG: **Small Heat-Shock Protein Hsp20 Phosphorylation Inhibits {beta}-Agonist-Induced Cardiac Apoptosis.** *Circ Res* 2004, **94(11)**:1474-1482.
43. Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R: **Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer.** *Exp Geront* 2007, **42(4)**:263-274.
44. Wadhwa KTaSCK: **An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where?** *Cell Stress Chaperones* 2002, **7(3)**:309-316.
45. Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocaris CC, Pereira-Smith OM, Reddel RR, Kaul SC: **Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis.** *Int J Cancer* 2006, **118(12)**:2973-2980.
46. Sugimoto A, Hozak RR, Nakashima T, Nishimoto T, Rothman JH: **dad-1, an endogenous programmed cell death suppressor in Caenorhabditis elegans and vertebrates.** *EMBO J* 1995, **14(18)**:4434-4441.
47. Nakashima T, Sekiguchi T, Kuraoka A, Fukushima K, Shibata Y, Komiyama S, Nishimoto T: **Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells.** *Mol Cell Biol* 1993, **13(10)**:6367-6374.
48. Gurbuxani S, Xu Y, Keerthivasan G, Wickrema A, Crispino JD: **Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102(32)**:11480-11485.
49. Yarm FR: **PIK Phosphorylation Regulates the Microtubule-Stabilizing Protein TCTP.** *Mol Cell Biol* 2002, **22(17)**:6209-6221.
50. Bommer U-A, Thiele B-J: **The translationally controlled tumour protein (TCTP).** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36(3)**:379-385.
51. Porter GW, Khuri FR, Fu H: **Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways.** *Sem Cancer Biol* 2006, **16(3)**:193-202.
52. Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME: **14-3-3 Proteins and Survival Kinases Cooperate to Inactivate BAD by BH3 Domain Phosphorylation.** *Mol Cell* 2000, **6(1)**:41-51.
53. Haar EV, Lee S-i, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H: **Insulin signaling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40.** *Nat Cell Biol* 2007, **9(3)**:316-323.
54. Pozuelo Rubio M, Geraghty KM, Wong BHC, Wood NT, Campbell DG, Morrice N, Mackintosh C: **14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking.** *Biochem J* 2004, **379(2)**:395-408.
55. Rios R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J: **Myostatin Regulates Cell Survival during C2C12 Myogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **280(2)**:561-566.
56. Yang W, Zhang Y, Ma G, Zhao X, Chen Y, Zhu D: **Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **326(3)**:660-666.
57. Adhietty PJ, Hood DA: **Mechanisms of Apoptosis in Skeletal Muscle.** *Basic Appl Myol* 2003, **13(4)**:171-179.
58. Koçtürk S, Kayatekin B, Resmi H, Açıköz O, Kaynak C, Özer E: **The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats.** *Eur J Appl Physiol* 2008, **102(5)**:515-524.
59. Spencer MJ, Walsh C, Dorshkind KA, Rodriguez EM, Tidball JG: **Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by per-**

- forin-mediated cytotoxicity.** *J Clin Invest* 1997, **99(11)**:2745-2751.
60. Dupont-Versteegden EE: **Apoptosis in muscle atrophy: Relevance to sarcopenia.** *Exp Geront* 2005, **40(6)**:473-481.
  61. Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, López-Soriano FJ, Fearon KCH, Argilés JM: **Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients.** *Clin Nutr* 2007, **26(5)**:614-618.
  62. Allen DL, Roy RR, Edgerton VR: **Myonuclear domains in muscle adaptation and disease.** *Muscle Nerve* 1999, **22(10)**:1350-1360.
  63. Primeau A, Adihetty PJ, Hood DA: **Apoptosis in heart and skeletal muscle.** *Can J Appl Physiol* 2002, **27(4)**:349-395.
  64. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G: **Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.** *Proc Natl Acad Sci* 2001, **98**:5116-5120.
  65. Mera R, Thompson H, Prasad C: **How to calculate sample size for an experiment: A case-based description.** *Nutr Neurosci* 1998, **1**:87-91.
  66. Lenth RV: **Statistical power calculations.** *J Anim Sci* 2007, **85(13\_suppl)**:E24-29.
  67. Bouley J, Chambon C, Picard B: **Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Proteomics* 2004, **4(6)**:1811-1824.
  68. Meunier B, Bouley J, Picard B, Bernard C, Picard B, Hocquette J-F: **Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis.** *Anal Biochem* 2005, **340(2)**:226-230.
  69. Picard B, Duris M-P, Jurie C: **Caractérisation des chaînes lourdes de myosine dans le muscle de bovin.** *INRA Prod Anim* 1998, **11(2)**:150-152.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

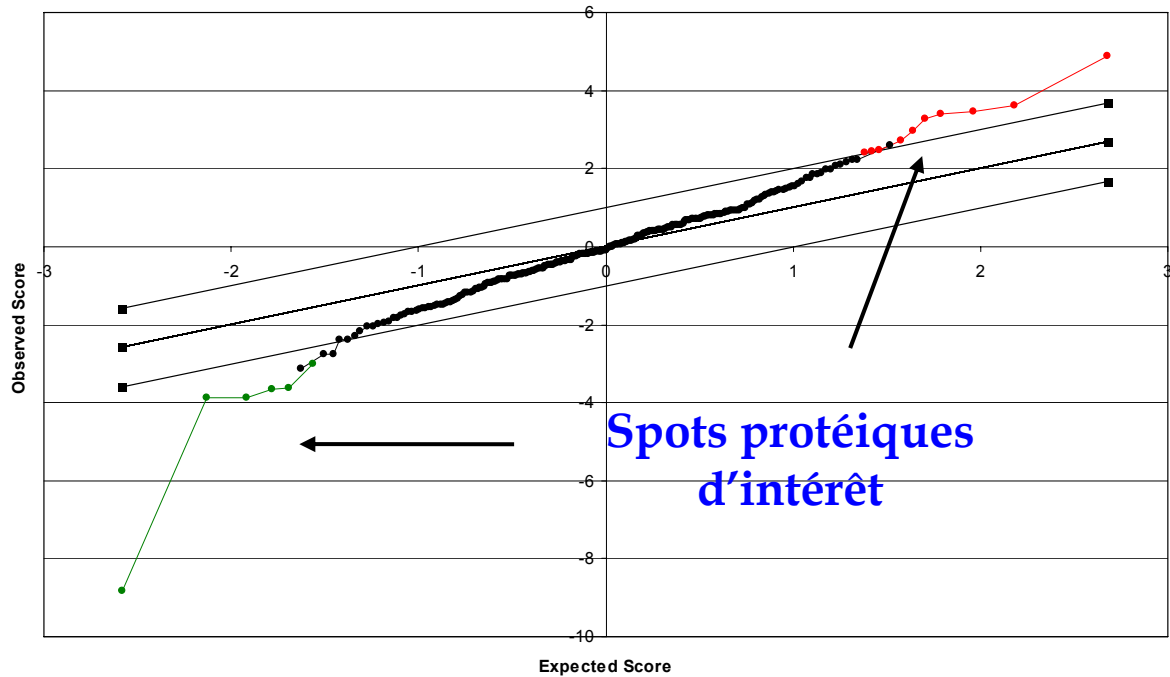
Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



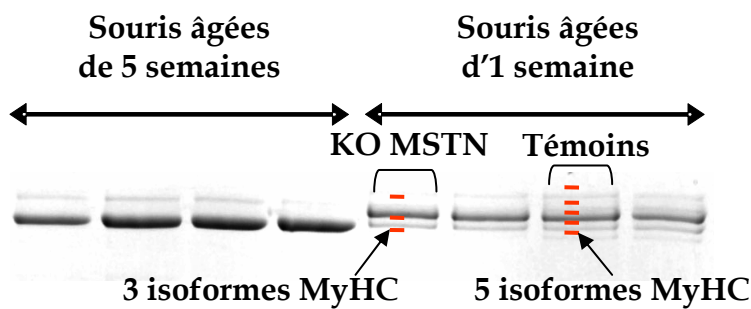
Significant: 16  
Median number of false positives: 0.71  
False Discovery Rate (%): 4.42

### SAM Plotsheet

Tail strength (%): 37.4  
se (%): 25



**Figure 24:** Analyse statistique des données de protéomique: le test SAM (Significance Analysis of Microarray) appliqué sur les 249 protéines (FDR<5%, FC>1.5) a révélé 20 spots sur-abondants et 18 sous-abondants dans le muscle *Quadriceps* des Souris KO MSTN en comparaison de leurs témoins.



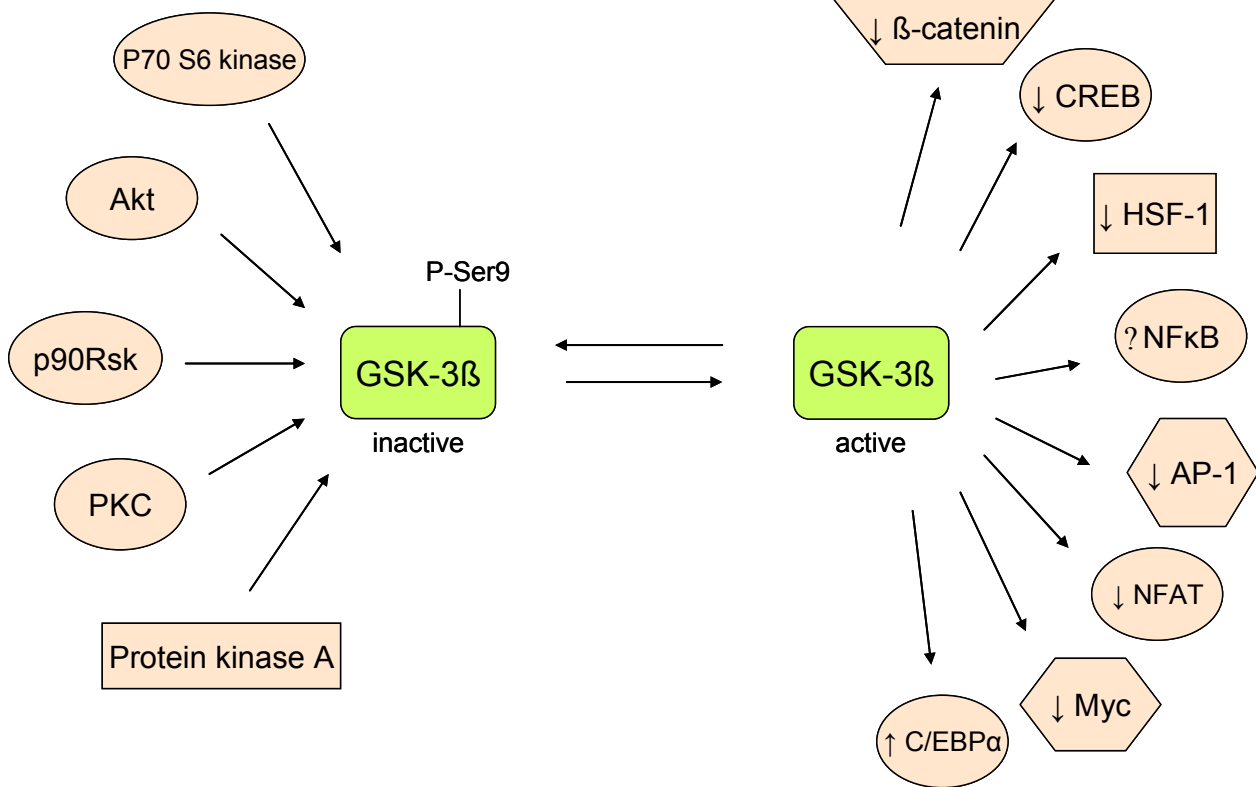
**Figure 25:** Retard de différenciation contractile dans le muscle *Quadriceps* des souris KO MSTN, révélé par le profil électrophorétique des isoformes de chaînes lourdes de myosine (MyHC) à une semaine d'âge.

## I.2. Résultats et discussion

Comme attendu, ce premier volet de ma thèse combinant deux approches de génomique fonctionnelle (transcriptomique et protéomique) a permis de révéler des signatures moléculaires (gènes et protéines différentiellement exprimés) associées à l'inactivation de la myostatine. *Ces signatures ont permis de mieux caractériser le phénotype musculaire des souris KO MSTN d'un point de vue moléculaire.* Une telle approche n'avait jamais été réalisée au début de ma thèse et récemment Welle *et al.* (2009b) ont rapporté l'influence d'un KO MSTN postnatal sur le profil transcriptomique de muscle *Gastrocnemius*.

Dans mon analyse, le muscle *Quadriceps* a été choisi car, parmi ceux qui avaient été prélevés, il présentait le degré d'hypertrophie le plus élevé (Figure 17). De manière surprenante, bien que l'hypertrophie soit marquée dans ce muscle, seulement un nombre limité de protéines et de transcrits d'intérêt a été mis en évidence. En effet, l'analyse protéomique n'a révélé une différence d'abondance que pour 38 spots protéiques sur 249 spots protéiques communs aux Souris KO MSTN et leurs témoins (20 sur abondants et 18 sous abondants; Figure 24) ce qui représente globalement 15,3% des spots retenus. De même, l'analyse transcriptomique a permis la mise en évidence de la sur-expression de 192 transcrits et la sous-expression de 245 transcrits sur les 2496 transcrits hybridés sur la puce ce qui représente globalement 17,5% des transcrits musculaires. Toutefois, dans les deux analyses, un pourcentage similaire de gènes et de protéines différentiellement exprimés a été mis en évidence.

*Un premier résultat marquant de ce travail est la mise en évidence que les profils moléculaires confirment une orientation glycolytique des muscles en réponse à l'inactivation de la MSTN.* L'abondance de MyBP, MyHCII, et des transcrits du métabolisme des glucides a été augmentée et l'abondance de H-FABP a été diminuée. De plus, une faible abondance de l'isoforme MyHC lent a été observée, ce qui indique l'existence d'un retard de différenciation dans les muscles squelettiques de souris KO MSTN (Figure 25). Ces données sont cohérentes avec les résultats publiés de l'équipe (Picard *et al.*, 1995, Hocquette *et al.*, 1998, Gagnière *et al.*, 2000, Bouley *et al.*, 2005, Cassar-Malek *et al.*, 2007) et les données de la littérature (Ashmore *et al.*, 1974, Wegner *et al.*, 2000). En accord avec ces données, il a été récemment montré que la myostatine a un effet négatif sur l'expression de la MyHC rapide IIX (Hayashi *et al.*, 2008) caractérisant les fibres musculaires rapides de type II. En revanche, dans l'étude récente de Welle *et al.* (2009b) l'inactivation de MSTN en période postnatale n'induit pas de



**Figure 26: Rôle clé de la GSK-3β dans différentes voies de signalisation cellulaires régulant la survie cellulaire.**

(D'après Jope et Bijur, 2002).

Cette figure est une représentation schématique des voies de signalisation régulant GSK-3β et facteurs de transcription régulés par GSK-3β : Cinq kinases sont connues pour phosphoryler la GSK-3β au niveau de l'acide aminé serine-9 inhibant ainsi son activité. GSK-3β activée est responsable de la phosphorylation de 8 facteurs de transcription en modulant leur activité.

modifications dans l'expression des gènes codant pour des isoformes lentes de protéines contractiles et des protéines de métabolisme énergétique.

*Le deuxième résultat marquant de l'étude est la démonstration que l'expression de gènes participant à la voie Wnt canonique est modifiée dans les muscles des souris KO MSTN, comme publié par Steelman et al. (2006) au début de ce travail sur le muscle Pectoralis du même modèle expérimental. De plus, cette étude a montré une sur-expression de FGF6, un facteur de croissance connu pour interagir avec les voies d'hypertrophie musculaire (Armand et al., 2004) et dont l'expression différentielle a été montrée chez des bovins à fort développement musculaire issus d'une sélection polygénique sur la croissance musculaire (Bernard et al., 2009).*

L'ensemble de ces premiers résultats permet de valider la pertinence de l'utilisation de ces deux techniques dans ce modèle pour identifier de nouvelles cibles de la myostatine. *Le troisième résultat majeur de cette étude est la mise en évidence d'autres processus altérés en réponse à la perte de fonction de la myostatine. Ceci a été montré notamment par l'expression différentielle de facteurs impliqués dans l'activité de la voie PI3K (DJ-1; GSK-3 $\beta$ , Pten, Akt, PI3KR3), un modulateur de la survie des myoblastes et dans la survie cellulaire/régulation négative de l'apoptose (PINK1, TCTP, HSP9A, 14-3-3 $\epsilon$  protein). Ceci suggère que la myostatine pourrait réguler les mécanismes de survie cellulaire et l'apoptose dans les muscles. L'expression différentielle des gènes impliqués dans l'apoptose avait déjà été révélée entre les bovins culards et les bovins conventionnels, dans l'analyse transcriptomique qui a fait l'objet de la publication Cassar-Malek et al., (2007). En l'absence de myostatine fonctionnelle, la survie cellulaire pourrait être favorisée via l'inactivation de la GSK-3 $\beta$ , une enzyme jouant un rôle clé dans plusieurs voies de signalisation, telles que les voies Wnt et NF- $\kappa$ B (figure 26) (Jope and Bijur, 2002). Ce mécanisme pourrait impliquer la surexpression du facteur anti-apoptotique DJ-1 (figure 2 de la publication 1), un régulateur indirect de la voie PI3K (Kim et al., 2005), qui constituerait ainsi une nouvelle cible de la perte de fonction de la myostatine. Cette hypothèse est étayée par une étude récente qui montre le rôle de la myostatine dans l'inhibition de la voie PI3K/Akt via Pten (Ji et al., 2008). D'autre part, la myostatine pourrait aussi moduler la mortalité (HSP9A) et la survie (TCTP, 14-3-3 $\epsilon$  protein, PINK1) des cellules musculaires. Ces actions n'avaient encore jamais été décrites.*

*En conclusion, ce premier travail a révélé de nouveaux candidats (gènes et protéines) susceptibles d'être impliqués dans l'hypertrophie musculaire induite par l'inactivation de la*



*myostatine. Il a été la base de la formulation d'une hypothèse selon laquelle la myostatine pourrait interagir avec les mécanismes de survie et d'apoptose dans les muscles squelettiques (C.f. figure n° 2 de la publication).*





*Article II : Chelsh et al. Soumis à  
"American Journal of Physiology - Cell  
Physiology"*



## II. Article n° 2: Myostatin regulates skeletal muscle apoptosis.

### II.1. Introduction à l'article II

Le premier volet de mon étude a révélé que parmi les voies biologiques modifiées en l'absence de la myostatine, le phénomène de l'apoptose constituait une cible potentielle de l'inactivation de la myostatine.

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) est un processus crucial pour le développement de l'organisme et nécessaire pour le maintien de l'homéostasie de différents tissus dont les caractéristiques ont été décrites depuis Kerr *et al.* (1972). Dans le muscle squelettique, ce phénomène a été largement décrit au cours de la myogenèse et de la régénération musculaire (Walsh, 1997, Sandri and Carraro, 1999). Dans certaines conditions pathologiques, dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (Spencer *et al.*, 1997), sarcopénie associée à l'âge (Dupont-Versteegden, 2005), dénervation chronique (De Castro Rodrigues *et al.*, 2006) et cancer (Busquets *et al.*, 2007), le nombre des myonuclei diminue suggérant l'implication de l'apoptose dans la perte de la masse musculaire (Allen *et al.*, 1995, Dupont-Versteegden, 2006). Dans le muscle squelettique, lors de l'apoptose, les myofibres affichent un certain nombre de modifications morphologiques et biochimiques telles que le bourgeonnement de la membrane cellulaire, l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN (McArdle *et al.*, 1999).

Des données de la littérature laissaient supposer qu'il existait un lien entre la myostatine et l'apoptose. Cependant, l'influence de la myostatine sur l'apoptose était largement controversée. Tout d'abord, il avait été montré que la surexpression ou le traitement de myostatine *in vitro* inhibait la prolifération de myoblastes C2C12 mais sans aucun effet sur la mort cellulaire (Thomas *et al.*, 2000). En revanche, d'autres études avaient montré que la surexpression de la myostatine protégeait les myoblastes de l'apoptose (Ríos *et al.*, 2002, Joulia *et al.*, 2003). Enfin Yang *et al.* (2005) avaient rapporté que la myostatine induisait l'apoptose des myoblastes *via* l'inhibition du facteur anti-apoptotique Nr-13.

Ce deuxième volet de mon travail avait donc pour but de vérifier l'hypothèse, issue de la première étude, selon laquelle l'apoptose serait régulée négativement en l'absence de myostatine fonctionnelle. Pour analyser le statut apoptotique dans le muscle *Quadriceps* de souris KO MSTN vs leurs témoins, j'ai mesuré l'abondance des transcrits et/ou des protéines impliqués dans l'apoptose par qPCR/PCRarray et par Western-blot. J'ai également utilisé la méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) pour quantifier les noyaux



apoptotiques par mesure du taux de la fragmentation de l'ADN sur coupes réalisées sur les mêmes muscles. C'est l'objet de la publication n°2, soumis au journal "American Journal of Physiology - Cell Physiology", qui a bénéficié d'une subvention ANR (programme MYOTROPHY, ANR BLAN08-2\_309209).



<b>Manuscript #</b>	C-00386-2009
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	26th Aug 09 09:21:47
<b><a href="#">Current Stage</a></b>	Manuscript Under Review
<b>Title</b>	<b>MYOSTATIN REGULATES SKELETAL MUSCLE APOPTOSIS</b>
<b>Running Title</b>	Resistance to skeletal muscle apoptosis in MSTN-null mice
<b>Manuscript Type</b>	Research Article
<b>Special Section</b>	N/A
<b>Category</b>	Growth, Differentiation and Apoptosis
<b>Corresponding Author</b>	Dr. Isabelle Cassar-Malek (INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores)
<b>Contributing Authors</b>	Ilham Chelh , Bruno Meunier , Brigitte Picard , James Reecy , Jean-François Hocquette, Isabelle Cassar-Malek

<b>Stage</b>	<b>Start Date</b>
Manuscript Under Review	26th Aug 09





1           **MYOSTATIN REGULATES SKELETAL MUSCLE APOPTOSIS**

2   **Ilham Chelh<sup>1</sup>, Bruno Meunier<sup>1</sup>, Brigitte Picard<sup>1</sup>, James Reecy<sup>2</sup>, Jean-François**  
3   **Hocquette<sup>1</sup> and Isabelle Cassar-Malek<sup>1</sup> \***

4   <sup>1</sup>INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Equipe Croissance et Métabolisme  
5   du Muscle, Centre Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, FRANCE. <sup>2</sup>

6   Iowa State University, Animal Science Dept., 2255 Kildee Hall Ames, IA 50011-3150, USA.

7  
8   \* **Corresponding author:** [isabelle.cassar-malek@clermont.inra.fr](mailto:isabelle.cassar-malek@clermont.inra.fr)

9  
10   **Running title:** resistance to skeletal muscle apoptosis in MSTN-null mice

11

12

FOR PEER REVIEW

13 **Abstract**

14 We recently identified several genes and proteins, which are involved in the protection of cells against  
15 apoptosis that were up-regulated in skeletal muscle that lacked functional Myostatin (MSTN). In the  
16 present study, we have examined the apoptotic pathway in the Quadriceps muscle of MSTN-null and  
17 wild-type mice. In the absence of functional MSTN, nuclei apoptosis was lowered as shown by a 3.6-  
18 fold decrease in the apoptotic myonuclear index in MSTN-null vs wild-type mice. By western blot  
19 analysis, we detected lower levels of active caspase-8, -9 and -3 and higher level of p-FADD protein in  
20 the muscles of MSTN-null mice. Two regulators of apoptosis (e.g Daxx and Id-2) also tended to be  
21 less abundant. The expression of anti-apoptotic members of Bcl2 family (e.g genes encoding bcl2l2,  
22 bcl10, and Bag3), Polb (a gene implicated in DNA replication), Akt1 (a thymoma viral proto-  
23 oncogene 1) and Api5 (an apoptosis inhibitor 5) were up-regulated. However, the genes involved in  
24 DNA degradation (Dffa, Dffb, Dapk1), Bax (a pro-apoptotic members of Bcl-2 family), and Bid (a  
25 Bcl2 interacting protein) were down-regulated in MSTN-null mice. Lastly, an increased expression of  
26 the Traf2 gene was found in the muscles of MSTN-null vs wild-type mice, which indicates that it may  
27 be involved in the regulation of skeletal muscle mass. These data demonstrated that MSTN  
28 inactivation is associated with attenuated skeletal muscle apoptosis and may be responsible for  
29 decreased nuclei loss in growing skeletal muscle of MSTN-null mice. This process may have  
30 physiological significance in the development of the hypertrophic status of skeletal muscles.

31

32 **Keywords:** Myostatin, apoptosis, muscle, hypertrophy

33

59 activation (53) and subsequently lead to Bax activation and apoptotic member Bcl-2  
60 inactivation (50).

61 In skeletal muscle, apoptosis of myoblasts is a normal process that removes excess myoblasts  
62 during myogenesis or regeneration (43, 48). However, its contribution to muscle homeostasis  
63 during growth remains less clear (40). During exposure to oxidative stress, myoblasts undergo  
64 similar morphologic changes to apoptosis without any destruction of the cell integrity (46).  
65 The myonuclear number decreases in muscles under some physiological and pathological  
66 conditions, such as hind limb suspension (3), and chronic denervation (14), Duchenne  
67 Muscular Dystrophy (DMD) (45), sarcopenia associated with aging (28) and cancer (7). All  
68 these findings suggest that apoptosis can contribute to muscle atrophy (17). Apoptosis during  
69 atrophy occurs in both myonuclei (58% of muscle nuclei) and other cells (endocytes,  
70 pericytes, fibrocytes and satellite cells) (18).

71 Myostatin (MSTN), a growth factor member of the TGF- $\beta$  superfamily, is involved in muscle  
72 development and maintenance of muscle mass homeostasis. We have recently analyzed the  
73 molecular profiling of MSTN-null vs wild-type mice using transcriptomic and proteomic  
74 approaches (11). We observed that several genes and proteins involved in the protection of  
75 cells against apoptosis process were up-regulated in MSTN-null mice (e.g. 14-3-3 $\epsilon$ , DJ-1,  
76 TCTP, Survivin). These data indicated that MSTN might regulate of survival/apoptosis in  
77 skeletal muscle. Myostatin inhibits the proliferation of myogenic cells through the control of  
78 cell cycle progression and myoblast differentiation (23). However, the link between MSTN  
79 and apoptosis is controversial. Different *in vitro* studies showed that MSTN C-terminal  
80 fragment did not influence myoblast apoptosis (47) or alternatively proved its protective  
81 effect on myoblast apoptosis (23, 41). Lastly, Yang *et al.* (52) suggested that MSTN could  
82 induce apoptosis in cultured foetal chicken myoblasts by inhibiting the expression of NR-13  
83 an anti-apoptotic factor, which sequesters the bcl-x activator of the apoptosis.

## 34 **Introduction**

35 Apoptotic processes are crucial for the development of multicellular organisms especially for  
36 the development, differentiation and aging of tissues (19, 21, 22). Apoptosis or programmed  
37 cell death, initially described as a form of highly controlled cellular death (25), was defined  
38 by some morphological variations, e.g. chromatin and cytoplasm condensation, DNA  
39 fragmentation and budding of the plasmic membrane (44). Two main signalling pathways  
40 have been described for the initiation of apoptosis, namely caspase-dependent or caspase-  
41 independent programs (Figure 1). The first pathway involves the activation of death receptors,  
42 which transduce the apoptotic signal via intracellular C terminal death domains (12), which is  
43 followed by recruitment of adaptor molecules such as FADD, which leads to the activation  
44 of the pro-caspase protease cascade (13). Activator caspases (e.g. caspase-8 and caspase-9)  
45 are responsible for the activation of an effector caspase (e.g. caspase-3) through the release of  
46 cytochrome-c from the mitochondria (55). Cytochrome-c plays a crucial role in the induction  
47 of apoptosis via the proteolysis of many vital substrates. The second pathway is a caspase-  
48 independent pathway, which also involves mitochondria by translocation of Apoptosis-  
49 Inducing Factor (AIF) and the endonuclease G (Endo-G) from the mitochondria to the  
50 cytoplasm (8, 31). Apoptosis signalling pathways are tightly controlled by anti- (negative) and  
51 pro- (positive) apoptotic mechanisms. For example, they involve members of the Bcl-2 family  
52 such as the anti-apoptotic members Bcl-2 and Bcl-x and the pro-apoptotic members Bad and  
53 Bax (49) (Figure 1). Bid, a pro-apoptotic protein which is cleaved and activated by caspase 8,  
54 is responsible for Bax activation and mitochondrial disruption (30, 54). Other proteins are also  
55 involved in the regulation of apoptosis like the Daxx protein. This protein increases Apoptosis  
56 Signal Regulating Kinase 1 (ASK1) activity (10). ASK1 is responsible for p38 mitogen  
57 activated protein kinase activation, which in turn is required for p53 phosphorylation followed  
58 by induction of apoptosis (15, 39). ASK1 can also mediate apoptosis via JNK pathway

84 In the present study, we have examined the status of apoptosis *in vivo* in relation to MSTN  
85 functionality in the muscle of mice. Our results clearly indicate that apoptosis is a downstream  
86 target of MSTN through the differential regulation of expression or activation of many pro-  
87 apoptotic and anti-apoptotic proteins in skeletal muscle.

88

## 89 **Material and Methods**

### 90 **Muscle samples**

91 The MSTN-null mice have a constitutive inactivation of the myostatin gene (36) and were  
92 compared to their control littermates (four animals per group). These mice were bred at the  
93 Iowa State University, euthanased at 5 weeks postnatally, and their muscle masses were  
94 dissected. Quadriceps muscle samples were snap-frozen and kept at – 80°C until their  
95 analysis.

### 96 **Detection of Apoptosis by TUNEL assay**

97 TUNEL assay (TdT-mediated dUTP nick end labeling) was used to detect and quantify  
98 apoptotic nuclei in mouse Quadriceps muscle.. The muscle sections were fixed in 4%  
99 paraformaldehyde in PBS pH 4.7, permeabilized in 0.1 Triton X-100 in 0.1 sodium citrate and  
100 incubated with the TUNEL reaction mixture [In situ cell death detection kit, fluorescein  
101 (Roche)]. All nuclei were detected using Hoechst 33342 Bisbenzimidazole (Sigma). The TUNEL-  
102 positive and Hoechst-positive nuclei were visualised under a fluorescence microscope  
103 (Labophot-2, Nikon), using excitation wavelengths of 450-490 nm and 360-370 nm  
104 respectively. Two images of the same area which represented a total field of view of 387µm x  
105 290µm were digitised from six random areas per sample, three samples per animals and four  
106 animals per group. Images were automatically analyzed using a home-made visual basic  
107 program developed under Visilog v6.4 software (Noesis, France). This program allows the

108 apoptosis index to be calculated as the ratio of the number of TUNEL-positive nuclei to the  
109 total number of Hoechst-positive nuclei.

#### 110 **Western blot analysis**

111 The steady state abundance of caspases and their regulators and targets were analyzed by  
112 western blot in both groups of animals (n=4). Thirty  $\mu$ g of proteins were size separated by gel  
113 electrophoresis using SDS-PAGE for 2h according to Laemmli's method (26). After  
114 migration, the proteins were transferred onto PVDF transfer membrane Millipore (Dutscher  
115 Dominique SAS, France). Membranes were then blocked with 5 non-fat milk in T-TBS 1X  
116 buffer (prepared from T-TBS 10X buffer: 113mM Tris-HCl, 87.5mM Tris base, 1.37M NaCl  
117 and 0.5 Tween 20) and incubated under gentle agitation overnight at room temperature in the  
118 presence of the following primary antibodies: CASP8, 1:2000 dilution of purified rabbit  
119 polyclonal anti-CASP8 antibody, was a gift from Dr. Ahmed Ouali (QuaPA unit, INRA  
120 Centre Clermont-Ferrand/Theix, France); CASP3, 1:4000 dilution of purified rabbit  
121 polyclonal anti-CASP3 antibody (sc-7148, Santa Cruz); CASP9, 1:8000 dilution of purified  
122 rabbit polyclonal anti-CASP9 antibody (sc-7885, Santa Cruz); p-FADD, 1:2000 dilution of  
123 purified rabbit polyclonal anti-p-FADD antibody (sc-33399-R, Santa Cruz); BID, 1:4000  
124 dilution of purified rabbit polyclonal anti-BID antibody (sc-11423, Santa Cruz); Id2, 1:4000  
125 dilution of purified rabbit polyclonal anti-Id2 antibody (sc-489, Santa Cruz); Daxx, 1:2000  
126 dilution of purified mouse monoclonal anti-Daxx antibody (sc- 8043, Santa Cruz); Actin,  
127 1:20000 dilution of purified mouse monoclonal anti-actin antibody (IgG2a, Clone AC40,  
128 Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), which are able to bind to its specific  
129 protein..

130 The blots were extensively washed with Tris buffer and incubated under gentle agitation with  
131 the secondary antibodies (anti-mouse, anti-goat or anti-rabbit IgG combined with conjugated  
132 with horseradish peroxidase 1: 20000 dilution) for 1h. The activity of the enzyme was

133 revealed by Enhanced Chemiluminescence kit (Amersham). The Western-blot photographic  
134 film was scanned with an Expression 10000XL PRO scanner (Epson) calibrated in optical  
135 density. Band volumes were quantified in the images using ImageQuant TL v2003 software  
136 (Amersham) and expressed as arbitrary densitometry units.

### 137 **RT<sup>2</sup> PCR-arrays**

138 A specific Mouse Apoptosis RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array (SABiosciences, Tebu-bio) was used  
139 to analyze the expression of genes implicated in the apoptosis process. It consisted of a 96-  
140 wells plate that contained 84 key genes involved in apoptosis plus gene controls. Total RNA  
141 was extracted previously from muscle tissue samples with TRIZOL® reagent (Life  
142 Technologies) according to the manufacturer's recommendation. The RNA was then purified  
143 and treated with DNase using the RNeasy® Mini kit (Qiagen, France). RNA integrity was  
144 checked using Lab Chip Agilent technology, as previously described (9). Pools of RNA from  
145 MSTN-null mice and controls were performed. The mRNA was converted into cDNA using  
146 the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences, Tebu-bio). cDNA was then added to the RT<sup>2</sup> SYBR  
147 Green/ROX qPCR Master Mix (SABiosciences, Tebu-bio) to obtain an experimental cocktail  
148 which was distributed in the wells of the PCR array. One array was analyzed per pool of  
149 samples. This allowed us to have a global view of the most differential genes involved in  
150 apoptosis between animal groups. PCR conditions were adapted according to the  
151 manufacturer's protocol to the ABI StepOnePlus instrument. The instrument's software  
152 calculated the Ct (threshold cycle) of PCR reaction in each well.

### 153 **Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis**

154 Five key genes for different apoptotic pathways leading to apoptosis were selected from the  
155 list of the 46 genes whose expression was declared differential by PCR array in order to  
156 confirm their expression profiling by quantitative RT-PCR using SYBR Green I dye and  
157 gene-specific primers pairs (SABiosciences, Tebu-bio). Individual samples were analyzed in

158 triplicate. The absolute quantity of each target gene was determined by using serially diluted  
159 standards to generate a standard curve. The concentration in pg/ $\mu$ mol of cDNA for each gene  
160 was determined by using a linear relationship between the amounts of standards cDNA and  
161 their Ct (Cycle threshold). Real-Time PCR (qPCR) expression levels were normalized using  
162 the ribosomal protein S6 (S6R) as reference gene. The power analysis (29) indicated that  
163 genes which present a minimum difference of 10 corresponding to a threshold FC of 1.1 could  
164 be detected.

### 165 **Statistical analysis**

166 The differences in proteins and transcripts levels between MSTN-null mice (n=4) and their  
167 controls (n=4) were analyzed by Student *t*-test. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard  
168 error of mean (SEM). A difference between groups was considered significant when:  $P <$   
169 0.05; \*, tendency was also reported when:  $P < 0.10$ ; t.

170

## 171 **Results**

### 172 **Apoptotic nuclei are observed at lower levels in the skeletal muscle of MSTN-null mice**

173 DNA breaks were detected in Quadriceps muscle sections using the TUNEL method (figure  
174 2A). The muscles of MSTN-null mice contained a significantly higher number of nuclei than  
175 those of control animals ( $244 \pm 13$  nuclei/area and  $179 \pm 5$  nuclei/area respectively,  $p < 0.05$ )  
176 (figure 2B). However, the incidence of TUNEL-positive nuclei was significantly lower in the  
177 MSTN-null skeletal muscle as compared to wild-type skeletal muscle (figure 2C). Similarly,  
178 apoptosis index, which was calculated by the ratio of the number of the TUNEL-positive  
179 nuclei to the total number of nuclei, was decreased in MSTN-null vs wild-type skeletal muscle  
180 (1.4 ‰ vs 5.1 ‰ respectively,  $p < 0.05$ ) (figure 2D).



181 **Decreased abundance of apoptotic proteins and their regulators in skeletal muscles of**  
182 **MSTN-null mice**

183 In order to evaluate the effect of presence and absence of functional Myostatin on apoptosis,  
184 we examined the steady state levels of caspases (-3, -8 and -9), which play a central role in the  
185 execution of apoptosis, FADD (a caspase activator), BID (a caspase 8 target), and Id2 and  
186 Daxx (two apoptosis regulators), by western-blot analysis.

187 **Caspases.** Western blots showed an increased abundance of the 57 kDa pro-caspase-8  
188 ( $p<0.05$ ) and a reduced abundance of the 18 kDa caspase-8 active fragment ( $p<0.05$ ) in the  
189 muscles of MSTN-null mice compared to wild-type ( $155 \pm 18$  vs  $97 \pm 7$  respectively for pro-  
190 caspase-8 and  $6 \pm 2$  vs  $15 \pm 0.7$  respectively for caspase-8 active fragment). No significant  
191 difference was observed between MSTN-null mice and wild-type controls for the 44/42 kDa  
192 cleaved intermediate fragment (figure 3A).

193 No significant difference was observed for pro-caspase-9 level between MSTN-null mice  
194 muscles and control muscles (figure 3B). However, the abundance of the cleaved intermediate  
195 35 kDa form of caspase-9 was reduced in skeletal muscle of MSTN-null mice vs wild-type  
196 controls ( $0.9 \pm 0.2$  vs  $4 \pm 0.8$  respectively,  $p<0.05$ ) (figure 3B). This result clearly demonstrated  
197 that caspase-9 was activated to a greater extent in wild-type than in MSTN-null skeletal  
198 muscle.

199 Significant reductions in the level of 32 kDa pro-caspase-3 ( $17 \pm 0.6$  vs  $32 \pm 3$ ,  $p<0.05$ ) and its  
200 11 kDa active fragment ( $5 \pm 2$  vs  $19 \pm 3$ ,  $p<0.05$ ) were detected in MSTN-null vs control skeletal  
201 muscle (figure 3C). However, no significant difference was detected for the cleaved 17 kDa  
202 and 20 kDa pro-caspase-3 intermediates. This low level of caspase-3 abundance and activity  
203 indicated an increased resistance to apoptosis in hypertrophied muscles.

204 **Caspase regulators and targets.** p-FADD a phosphorylated form of Fas-associated death  
205 domain protein (FADD) was quantitated by western-blot. A higher level of phosphorylated

206 Fas-associated death domain protein (FADD) was observed in the skeletal muscle of MSTN-  
207 null mice as compared to those of controls ( $10 \pm 1$  vs  $5 \pm 1$  respectively,  $p < 0.05$ ) (figure 4A).  
208 Since the unphosphorylated form of FADD is a caspase-8 activator, this result was in  
209 accordance with the lower abundance of the caspase-8 active fragment (figure 2A).  
210 Bid was visualized by western blot as two distinct bands, a 22 kDa and its truncated 14 kDa  
211 active form tBID. A significant reduction of both p22 ( $42 \pm 6$  vs  $68 \pm 9$ ,  $p < 0.05$ ) and p14 ( $22 \pm 4$   
212 vs  $37 \pm 2$ ,  $p < 0.05$ ) band abundance was observed in the muscles of MSTN-null mice compared  
213 to controls (figure 4B).  
214 Lastly, the abundance of two positive regulators of apoptosis, Id2 (Inhibitor of differentiation-  
215 2) and Daxx, tended to decrease in the muscles of MSTN-null mice compared to controls  
216 ( $10 \pm 2$  vs  $15 \pm 1$ , and  $26 \pm 9$  vs  $59 \pm 12$ , respectively,  $p < 0.1$ ) (figure 4C, 4D).

#### 217 **Differential expression of genes related to apoptosis**

218 In order to screen the expression of genes related to apoptosis in the muscles of MSTN-null  
219 mice vs control littermates, we used a real-time PCR array, which enabled the expression  
220 profiling of 84 key apoptotic genes in pools of cDNAs. Forty-six genes presented more than  
221 2-fold differential expression. (Figure 5A, 5B). Among them, anti-apoptotic members of the  
222 Bcl2 family (e.g. bcl2l2, bcl10, Bag3) and Api5 were up-regulated. However, the expression  
223 level of Dffa, Dffb, Dapk1, which are genes involved in DNA degradation, Bax, a pro-  
224 apoptotic member of Bcl-2 family, and BID, a Bcl2 interacting protein, were down-regulated  
225 in MSTN-null mice. The expression level of five genes (Api5, Traf2, Bcl2l2, Dffa, Casp9)  
226 were checked by real-time PCR (Table 1). Differential expression for 4 of them was  
227 validated.

228

## 229 **Discussion**

230 In a previous paper, we reported that several genes and proteins involved in the protection of  
231 cells against apoptosis were up-regulated (e.g. 14-3-3 $\epsilon$ , DJ-1, TCTP, Survivin) in skeletal  
232 muscle in the context of myostatin inactivation (11). Subsequently, we hypothesized that  
233 Myostatin loss-of-function might induce a decrease in apoptosis in skeletal muscle, a process  
234 that could contribute to fiber hypertrophy by modulating myonuclear numbers and/or the  
235 myonuclear to cytosolic ratio. In the present study, we have examined the apoptotic pathway  
236 in MSTN-null and wild-type skeletal muscle and demonstrated that the absence of functional  
237 Myostatin is associated with an alteration of nuclei apoptosis. First, in the wild-type muscle,  
238 the frequency of apoptosis, which was low, was similar to levels previously reported in  
239 physiopathological conditions (1). Interestingly, we observed a significant 3.6-fold decrease  
240 in the apoptotic nuclear index in the myofibers of MSTN-null mice compared to their  
241 controls. Secondly, we detected lower levels of active caspase-8, -9 and -3. Caspases are a  
242 family of proteolytic enzymes, which play a key role in both the initiation and execution of  
243 apoptosis (Figure 1). They are synthesized in a proenzyme form and are activated by cleavage  
244 at aspartate residues (13). The active form of caspase-8 is responsible for the activation  
245 cascade of the other caspases. Thus, our observation of reduced abundance of activated form  
246 of caspase-9 (activator) and caspase-3 (effector) was consistent with the lower abundance of  
247 activated caspase-8 and provided for the first time convincing evidence of attenuated caspase-  
248 dependent pathway activity in the muscle of MSTN-null mice.

249 Thirdly, our data also highlighted the engagement of upstream regulators of apoptosis and  
250 multiple caspase targets. Indeed, the abundance of the phosphorylated FADD and members of  
251 the Bcl-2 family differed between MSTN-null mice and their controls. FADD is an adapter  
252 protein, which interacts with the cytoplasmic domain of the Fas death receptor (Fas signaling  
253 pathway, Figure 1) and initiates apoptosis upon dephosphorylation through caspase-8

254 activation (12). However, the phosphorylation of FADD regulates its non-apoptotic activities  
255 and is crucial for progression and proliferation activities (2). The higher level of p-FADD  
256 protein in the skeletal muscle of MSTN-null mice was consistent with the decreased  
257 abundance of activated caspase-8. Two regulators of apoptosis (e.g Daxx and Id-2) also  
258 tended to be less abundant. The pro-apoptotic protein Daxx plays a role in the activation of  
259 ASK1, which is essential to JNK activation and then apoptosis induction (10, 39, 53). Daxx  
260 also interacts with Fas receptor and potentiates its pro-apoptotic action (53). The Inhibitor of  
261 differentiation-2 (Id2) has been associated with apoptosis-associated atrophy of skeletal  
262 muscles (5) and can promote apoptosis by enhancing expression of apoptotic genes (20).  
263 Moreover, expression of some regulators of the caspase-dependent pathway also differed  
264 between muscles of MSTN-null mice and their controls. The expression level of anti-  
265 apoptotic members of Bcl2 family (e.g genes encoding bcl2l2, bcl10, Bag3), Polb (a gene  
266 implicated in DNA replication), Akt1 (a thymoma viral proto-oncogene 1), and Api5 (an  
267 apoptosis inhibitor 5), which confer a resistance to apoptosis by modulating E2F-induced  
268 apoptosis (38), were up-regulated. However, genes involved in DNA degradation (Dffa, Dffb,  
269 Dapk1), Bax, a pro-apoptotic members of Bcl-2 family, and BID a Bcl2 interacting protein  
270 were down-regulated in MSTN-null mice. Bid was identified as an important substrate of  
271 Caspase-8 in the Fas signaling pathway (30). The activated form of Bid is responsible for  
272 mitochondrial damage (33) (Figure 1) through activation of Bax, a pro-apoptotic protein  
273 member of Bcl-2 family. Here, we observed a significant reduction in both Bid mRNA and  
274 activated Bid protein abundance in agreement with the decreased abundance of activated  
275 caspase-8.

276 Lastly, our study also enabled the identification of new targets of Myostatin, e.g. members of  
277 the Traf family that are signal transducers of Tumor Necrosis Factor (TNF) pathway (6).  
278 Particularly, we observed increased expression of the Traf2 gene in the skeletal muscle of

279 MSTN-null mice as compared to littermate controls. Traf2 has been identified as a prime  
280 mediator of TNF-induced activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B (42) which may  
281 mediate the anti-apoptotic response (27). It has been speculated that Traf2 may also provide a  
282 survival signal through a NF- $\kappa$ B-independent pathway by controlling the expression of the  
283 lung Krüppel-like factor transcription factor, which is independent of TNF signaling (32).  
284 Interestingly, Traf2  $-/-$  mice are born with severely decreased skeletal muscle abundance,  
285 which indicates that it is necessary for normal muscle viability (35). Traf2 is present at high  
286 levels in terminally differentiated skeletal muscles in the developing mice. Thus, increased  
287 expression of Traf2 may also play a key role in the hypertrophic status of muscles in MSTN-  
288 null mice.

289 All together, these results indicate that the skeletal muscle of MSTN-null mice may have  
290 acquired a resistance to apoptosis, a process that may contribute to muscular hypertrophy. In  
291 muscle, apoptosis is considered mainly as a part of the developmental process (43) and can  
292 occur albeit rarely in normal fibers even after birth (37). Skeletal muscle contains a high  
293 amount of endogenous inhibitors of apoptosis that may participate in an inherent defence  
294 against apoptosis (40) and therefore maintain a constant muscle mass. The role of apoptosis in  
295 the loss of muscle mass has been clearly established under physiological (exercise) and  
296 pathological conditions (e.g. muscle disuse-induced atrophy, denervation, ageing,  
297 dystrophinopathies) (16). Specifically, it has been shown that apoptosis is involved in the loss  
298 of nuclei and that the caspase-3 pathway plays a crucial role in this process. “Myonuclear  
299 apoptosis” is a predominant form of apoptosis by which a loss of nuclei occurs without cell  
300 death during muscle atrophy (4, 40). Although there are yet no data to link hypertrophy to  
301 altered apoptosis, atrophy and hypertrophy pathways may cross-talk via Myostatin. According  
302 to the present data, several mechanisms probably contribute to the hypertrophic status of  
303 MSTN-null mice by regulating the balance between atrophy and hypertrophy in muscle.

304 Attenuated apoptosis in the context of myostatin inactivation could rescue nuclei from  
305 elimination. Based on the concept that one nucleus controls a specific cytoplasmic territory  
306 (Cheek hypothesis), maintenance of a constant number of myonuclei would result in a  
307 substantial gain of nuclear domain and consequently of anabolic activity and fiber growth.  
308 This process likely takes part to fiber hypertrophy together with increased muscle fiber  
309 numbers, satellite cell recruitment and anabolic pathways (24, 34).

310

## 311 **Conclusion**

312 Using functional genomic approaches, we have previously hypothesised that apoptosis may  
313 be a target of Myostatin loss of function. In this study, we validated this hypothesis by  
314 showing that Myostatin inactivation is associated with attenuation of apoptosis in skeletal  
315 muscle. This occurs through decreased loss of nuclei, down-regulation of pro-apoptotic  
316 factors and up-regulation of anti-apoptotic factors in the growth of skeletal muscle. This  
317 process may have physiological significance in the development of the hypertrophic status of  
318 skeletal muscles. Further experiments are needed to determine the cellular origin of nuclei  
319 affected by Myostatin loss-of-function (e.g myonuclei and/or satellite cells).

320

## 321 **Acknowledgements**

322 The authors thank G. Gentes and C. Barboiron for their skilled collaboration. The study was  
323 granted by ANR (for the MYOTROPHY project: ANR BLAN08-2\_309209). The authors  
324 acknowledge Karen E Langner (Iowa State University,USA) for kindly providing mice  
325 muscle samples, Dr A. Listrat (UR1213 URH, INRA, Clermont-Ferrand/Theix, FRANCE) for  
326 helpful discussions, and Dr A. Ouali (UR370 QuaPA, INRA, Clermont-Ferrand/Theix,  
327 FRANCE) for kindly providing the Caspase 8 antibody.

328

329 **References**

330

- 331 1. **Agusti AGN, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, Batle S, and Busquets**  
332 **X.** Skeletal Muscle Apoptosis and Weight Loss in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J*  
333 *Respir Crit Care Med* 166: 485-489, 2002.
- 334 2. **Alappat EC, Feig C, Boyerinas B, Volkland J, Samuels M, Murmann AE, Thorburn A,**  
335 **Kidd VJ, Slaughter CA, Osborn SL, Winoto A, Tang W-J, and Peter ME.** Phosphorylation of  
336 FADD at Serine 194 by CKI[alpha] Regulates Its Nonapoptotic Activities. *Molecular Cell* 19: 321-  
337 332, 2005.
- 338 3. **Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Bigbee AJ, Grindeland RE, Mukku V, and Edgerton**  
339 **VR.** Apoptosis: a mechanism contributing to remodeling of skeletal muscle in response to hindlimb  
340 unweighting. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C579-587, 1997.
- 341 4. **Allen DL, Roland R, Roy V, and Reggie E.** Myonuclear domains in muscle adaptation and  
342 disease. *Muscle & Nerve* 22: 1350-1360, 1999.
- 343 5. **Alway SE, Martyn JK, Ouyang J, Chaudhrai A, and Murlasits ZS.** Id2 expression during  
344 apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *Am J Physiol*  
345 *Regul Integr Comp Physiol* 284: R540-549, 2003.
- 346 6. **Arch RH, Gedrich RW, and Thompson CB.** Tumor necrosis factor receptor-associated  
347 factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes & Development* 12:  
348 2821-2830, 1998.
- 349 7. **Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, López-Soriano FJ, Fearon KCH,**  
350 **and Argilés JM.** Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients.  
351 *Clinical Nutrition* 26: 614-618, 2007.
- 352 8. **Cande C, Cecconi F, Dessen P, and Kroemer G.** Apoptosis-inducing factor (AIF): key to  
353 the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 115: 4727-4734, 2002.
- 354 9. **Cassar-Malek I, Passelaigue F, Bernard C, Leger J, and Hocquette J-F.** Target genes of  
355 myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses. *BMC Genomics* 8: 63, 2007.

- 356 10. **Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H, and Baltimore D.** Activation of Apoptosis  
357 Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by the Adapter Protein Daxx. *Science* 281: 1860-1863, 1998.
- 358 11. **Chelh I, Meunier B, Picard B, Reecy M, Chevalier C, Hocquette J-F, and Cassar-Malek**  
359 **I.** Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic  
360 pathways as myostatin targets. *BMC Genomics* 10: 196, 2009.
- 361 12. **Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, and Dixit VM.** FADD, a novel death domain-  
362 containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* 81: 505-512,  
363 1995.
- 364 13. **Cohen GM.** Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16, 1997.
- 365 14. **De Castro Rodrigues A, Andreo JC, and De Mattos Rodrigues SP.** Myonuclei and satellite  
366 cells in denervated rat muscles: An electron microscopy study. *Microsurgery* 26: 396-398, 2006.
- 367 15. **Desbiens KM, Deschesnes RnG, Labrie MM, DesfossÃ©s Y, Lambert H, Landry J, and**  
368 **Bellmann K.** c-Myc potentiates the mitochondrial pathway of apoptosis by acting upstream of  
369 apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1) in the p38 signalling cascade. *Biochem J* 372: 631-641,  
370 2003.
- 371 16. **Dupont-Versteegden EE.** Apoptosis in muscle atrophy: Relevance to sarcopenia.  
372 *Experimental Gerontology* 40: 473-481, 2005.
- 373 17. **Dupont-Versteegden EE.** Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World J*  
374 *Gastroenterol* ; 12: 7463-7466, 2006.
- 375 18. **Dupont-Versteegden EE, Strotman BA, Gurley CM, Gaddy D, Knox M, Fluckey JD, and**  
376 **Peterson CA.** Nuclear translocation of EndoG at the initiation of disuse muscle atrophy and apoptosis  
377 is specific to myonuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R1730-1740, 2006.
- 378 19. **Fernando P, and Megeney LA.** Is caspase-dependent apoptosis only cell differentiation taken  
379 to the extreme? *FASEB J* 21: 8-17, 2007.
- 380 20. **Florio M, Hernandez M-C, Yang H, Shu H-K, Cleveland JL, and Israel MA.** Id2  
381 Promotes Apoptosis by a Novel Mechanism Independent of Dimerization to Basic Helix-Loop-Helix  
382 Factors. *Mol Cell Biol* 18: 5435-5444, 1998.



- 383 21. **Higami Y, and Shimokawa I.** Apoptosis in the aging process. *Cell and Tissue Research* 301:  
384 125-132, 2000.
- 385 22. **Jacobson MD, Weil M, and Raff MC.** Programmed Cell Death in Animal Development.  
386 *Cell* 88: 347-354, 1997.
- 387 23. **Jouliia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, and Cabello G.** Mechanisms  
388 involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental*  
389 *Cell Research* 286: 263-275, 2003.
- 390 24. **Kawano F, Takeno Y, Nakai N, Higo Y, Terada M, Ohira T, Nonaka I, and Ohira Y.**  
391 Essential role of satellite cells in the growth of rat soleus muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol*  
392 295: C458-467, 2008.
- 393 25. **Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-  
394 ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-257., 1972.
- 395 26. **Laemmli UK.** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of  
396 Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- 397 27. **Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, and Choi Y.** TRAF2 Is  
398 Essential for JNK but Not NF-[kappa]B Activation and Regulates Lymphocyte Proliferation and  
399 Survival. *Immunity* 7: 703-713, 1997.
- 400 28. **Leeuwenburgh C.** Role of Apoptosis in Sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58: M999-  
401 1001, 2003.
- 402 29. **Lenth RV.** Statistical power calculations. *J Anim Sci* 85: E24-29, 2007.
- 403 30. **Li H, Zhu H, Xu C-j, and Yuan J.** Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the  
404 Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94: 491-501, 1998.
- 405 31. **Li LY, Luo X, and Wang X.** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from  
406 mitochondria. *Nature* 412: 95-99, 2001.
- 407 32. **Lin Y, Ryan J, Lewis J, Wani MA, Lingrel JB, and Liu Z-g.** TRAF2 Exerts Its  
408 Antiapoptotic Effect by Regulating the Expression of Kruppel-Like Factor LKLF. *Mol Cell Biol* 23:  
409 5849-5856, 2003.

- 410 33. **Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, and Wang X.** Bid, a Bcl2 Interacting Protein,  
411 Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death  
412 Receptors. *Cell* 94: 481-490, 1998.
- 413 34. **Machida S, and Booth FW.** Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for  
414 satellite cell proliferation. *Proceedings of the Nutrition Society* 63: 337-340, 2004.
- 415 35. **MacLachlan TK, and Giordano A.** TRAF2 expression in differentiated muscle. *Journal of*  
416 *Cellular Biochemistry* 71: 461-466, 1998.
- 417 36. **McPherron AC, Lawler AM, and Lee S-J.** Regulation of skeletal muscle mass in mice by a  
418 new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387: 83-90, 1997.
- 419 37. **Migheli A, Mongini T, Doriguzzi C, Chiado-Piat L, Piva R, Ugo I, and Palmucci L.**  
420 Muscle apoptosis in humans occurs in normal and denervated muscle, but not in myotonic dystrophy,  
421 dystrophinopathies or inflammatory disease. *neurogenetics* 1: 81-87, 1997.
- 422 38. **Morris EJ, Michaud WA, Ji J-Y, Moon N-S, Rocco JW, and Dyson NJ.** Functional  
423 Identification of Api5 as a Suppressor of E2F-Dependent Apoptosis In Vivo. *PLoS Genetics* 2: e196,  
424 2006.
- 425 39. **Perfettini J-L, Castedo M, Nardacci R, Ciccocanti F, Boya P, Roumier T, Larochette N,**  
426 **Piacentini M, and Kroemer G.** Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis  
427 induction by the HIV-1 envelope. *J Exp Med* 201: 279-289, 2005.
- 428 40. **Primeau A, Adhietty PJ and Hood DA.** Apoptosis in heart and skeletal muscle. *1: Can J*  
429 *Appl Physiol* 27: 349-395, 2002.
- 430 41. **Ríos R, Carneiro I, Arce VM, and Devesa J.** Myostatin Regulates Cell Survival during  
431 C2C12 Myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280: 561-566, 2001.
- 432 42. **Rothe M, Sarma V, Dixit VM, and Goeddel DV.** TRAF2-mediated activation of NF-kappa  
433 B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 269: 1424-1427, 1995.
- 434 43. **Sandri M, and Carraro U.** Apoptosis of skeletal muscles during development and disease.  
435 *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31: 1373-1390, 1999.
- 436 44. **Saraste A, and Pulkki K.** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc*  
437 *Res* 45: 528-537, 2000.

- 438 45. **Spencer MJ, Walsh C, Dorshkind KA, Rodriguez EM, and Tidball JG.** Myonuclear  
439 apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *Clinical Investigation*  
440 99: 2745-2751, 1997.
- 441 46. **Stangel M, Zettl UK, Mix E, Zielasek J, Toyka KV, Hartung HP, and Gold R.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  
442 Nitric Oxide-mediated Oxidative Stress Induce Apoptosis in Rat Skeletal Muscle Myoblasts.  
443 *Neuropathology & Experimental Neurology* 55: 36-43, 1996
- 444 47. **Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, and Kambadur R.** Myostatin,  
445 a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. *J Biol Chem*  
446 275: 40235-40243, 2000.
- 447 48. **Walsh K.** Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Progress in*  
448 *cell cycle research* 3: 53-58, 1997.
- 449 49. **White E.** Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes & Development* 10: 1-15, 1996.
- 450 50. **Whitmarsh AJ, and Davis RJ.** Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer.  
451 *Oncogene* 26: 3172-3184.
- 452 51. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, and Wang X.**  
453 Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science* 275:  
454 1129-1132, 1997.
- 455 52. **Yang W, Zhang Y, Ma G, Zhao X, Chen Y, and Zhu D.** Identification of gene expression  
456 modifications in myostatin-stimulated myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research*  
457 *Communications* 326: 660-666, 2005.
- 458 53. **Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, and Baltimore D.** Daxx, a Novel Fas-Binding Protein  
459 That Activates JNK and Apoptosis. *Cell* 89: 1067-1076, 1997.
- 460 54. **Yi X, Yin X-M, and Dong Z.** Inhibition of Bid-induced Apoptosis by Bcl-2. tBid insertion,  
461 Bax translocation, and Bax/Bak oligomerization suppressed. *J Biol Chem* 278: 16992-16999, 2003.
- 462 55. **Zou H, Li Y, Liu X, and Wang X.** An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a  
463 Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *J Biol Chem* 274: 11549-11556, 1999.

464 **Legends for figures**

465

466 **Figure 1. Caspase-dependent or -independent pathways that lead to apoptosis.**

467 The caspase-dependent pathway can be activated by FasL interaction with the transmembrane  
468 death receptor to induce apoptosis. This binding leads to the recruitment of an adaptor protein  
469 known as Fas-associated death domain protein (FADD) on the cytoplasmic side of the death  
470 receptor. FADD, in turn, recruits and activates pro-caspase-8. Active caspase-8 can also  
471 cleave BID protein to tBID which mediates cytochrome c release from mitochondria through  
472 Bax translocation from the cytosol to mitochondria. This pathway can be blocked by Akt  
473 which phosphorylates Bad to facilitate Bad/14-3-3 interaction and prevention of Bad/Bcl-2  
474 interactions and subsequently Bax activation. Active caspase-8 can also cleave and activate  
475 other known caspases such as caspase-3.

476 Release of cytochrome-c facilitates conformational changes in Apaf1, the specific activator of  
477 pro-caspase-9. The cytochrome-c, Apaf1 and caspase-9 complex is called apoptosome. Active  
478 caspase-9 then activates caspase-3 the major effector caspase that is responsible for  
479 destruction and cleavage of various substrates as cytoskeletal proteins and damage DNA.  
480 Daxx binds to Fas death receptor, mediates apoptosis pathway through ASK1 and JNK  
481 activation and then lead to Bax activation and Bcl-2 inactivation. Daxx can also activate p38  
482 MAPK and the p53 phosphorylation and activation.

483 The caspase-independent pathway involves AIF and EndoG which are responsible for DNA  
484 damage after their release from the mitochondria to the cytoplasm.

485 Also, Id2 has been shown to mediate the expression of cell death genes.

486 Adapted from (8, 12, 31, 51).

487

488

489 **Figure 2. Lower frequency of apoptotic nuclei in the muscles of MSTN-null mice.**

490 **A:** Detection of apoptotic nuclei with TUNEL assays in the Quadriceps muscles of MSTN-  
491 null and wild-type mice. Arrows indicate the TUNEL-positive nuclei detected in each area  
492 (387 $\mu$ m x 290 $\mu$ m) and colored in blue in the final overlaid picture. Nuclei were stained by  
493 Hoechst 33342 Bisbenzimidazole and appeared in orange. **B:** Total numbers of nuclei per area in  
494 the MSTN-null and wild-type skeletal muscle. **C:** Numbers of TUNEL-positive nuclei in the  
495 MSTN-null and wild-type skeletal muscle. **D:** Apoptosis index calculated as the ratio of the  
496 number of the TUNEL-positive nuclei to the total number of nuclei. All data were expressed  
497 as means  $\pm$  SEM. \* P<0.05.

498

499 **Figure 3. Abundance of caspase fragments in the muscles of MSTN-null mice and wild-**  
500 **type controls as determined by western blot analysis.**

501 **A:** Abundance of pro-caspase-8 (p57), caspase-8 active fragment (p18) and the cleaved  
502 intermediate fragment (p 44/42). **B:** Abundance of pro-caspase-9 and the cleaved intermediate  
503 form of caspase-9 (p35). **C:** Abundance of pro-caspase-3 (p32), its active fragment (p11) and  
504 the cleaved intermediate fragments (p17 and p20). Results are presented as arbitrary  
505 densitometry unit means  $\pm$  SEM. \*: P<0.05.

506

507 **Figure 4. Abundance of caspase regulators and targets in the MSTN-null mice and wild-**  
508 **type skeletal muscle as determined by western blot analysis.**

509 **A:** Phosphorylated form of FADD protein. **B:** BID (p22) and its truncated active form tBID  
510 (p14). **C:** Id2. **D:** Daxx. Results are presented as arbitrary densitometry unit means  $\pm$  SEM. \*:  
511 P<0.05, t: P<0.1

512

513 **Figure 5. Genes profiling of MSTN-null vs wild-type mice as analyzed by real time PCR**  
514 **array.**

515 Expression of 84 key genes involved in apoptosis in MSTN null mice vs their controls.

516 Description of all these genes is available at SABiosciences web site. Bars represent the

517 difference of gene expression between MSTN-null mice and their controls with genes

518 regrouping based on functional similarity.

519

FOR PEER REVIEW

520 **Tables**

521

522 **Table 1: Differential expression of key genes involved in regulation apoptosis in MSTN-**  
523 **null vs control littermates.**

524

Gene Symbol	Fold-change
<b>Api5</b>	1.5
<b>Traf2</b>	1.4
<b>Bcl2l2</b>	1.4
<b>Dffa</b>	-1.2
<b>Casp9</b>	-1.2 <sup>t</sup>

525

526 Results are expressed as fold changes (MSTN-null vs controls) and all the differences have  
527 been declared significant ( $P < 0.05$ ) except for some tendencies (t:  $P < 0.10$ ). ns: not  
528 significant.

529 Api5: Apoptosis inhibitor 5; Traf2: Tnf receptor-associated factor 2; Bcl2l2: Bcl2-like 2;  
530 Dffa: DNA fragmentation factor, alpha subunit; Casp9: Caspase 9; Bad: Bcl-associated death  
531 promoter.

532

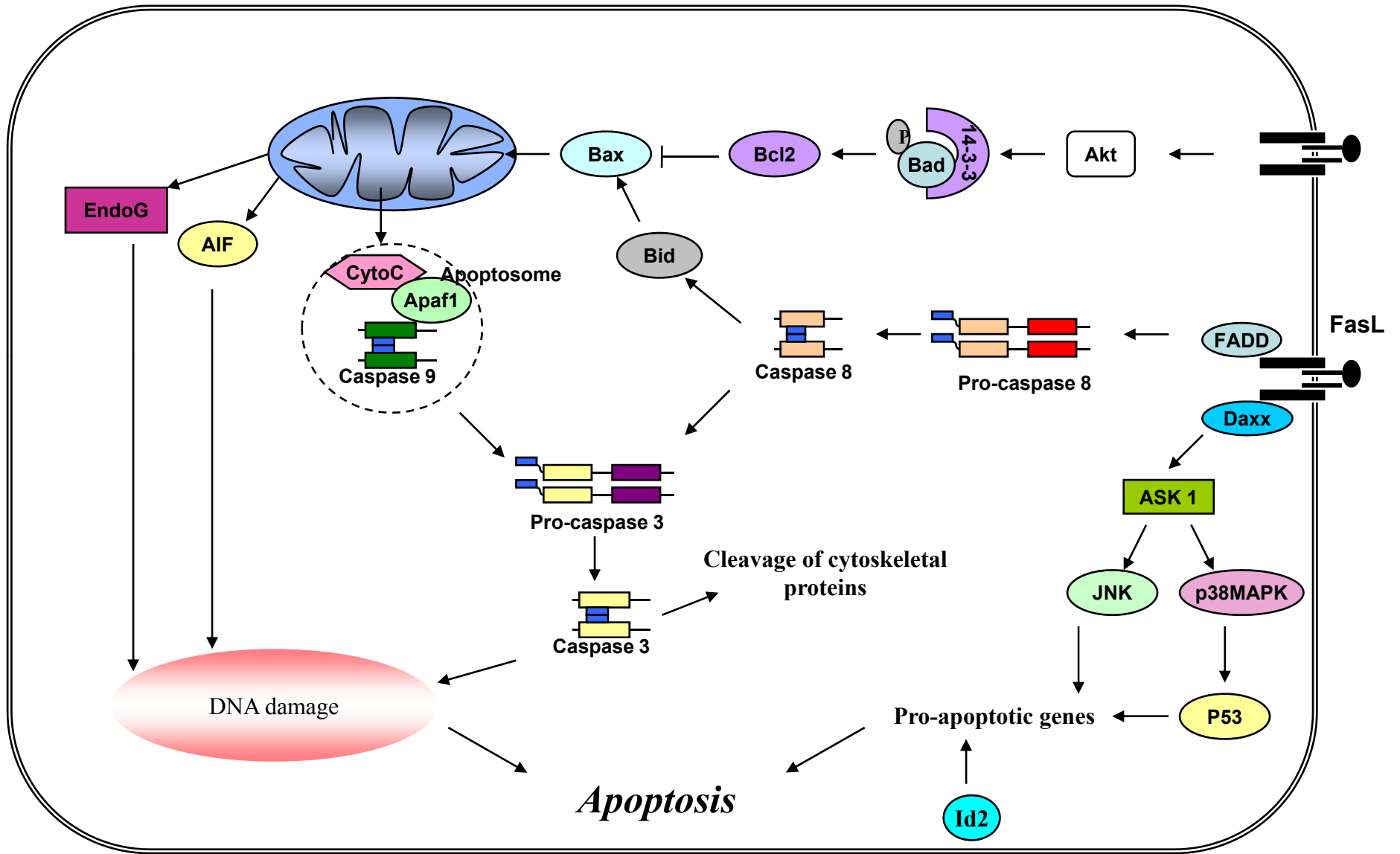


Figure 1



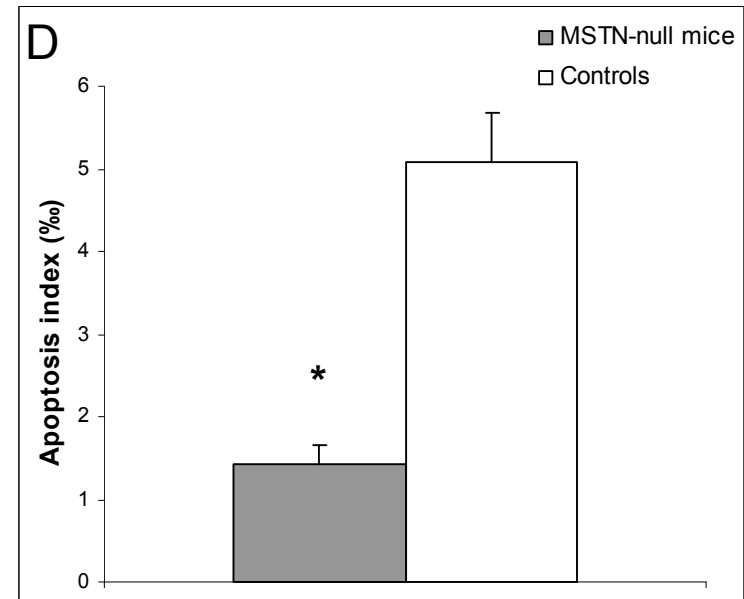
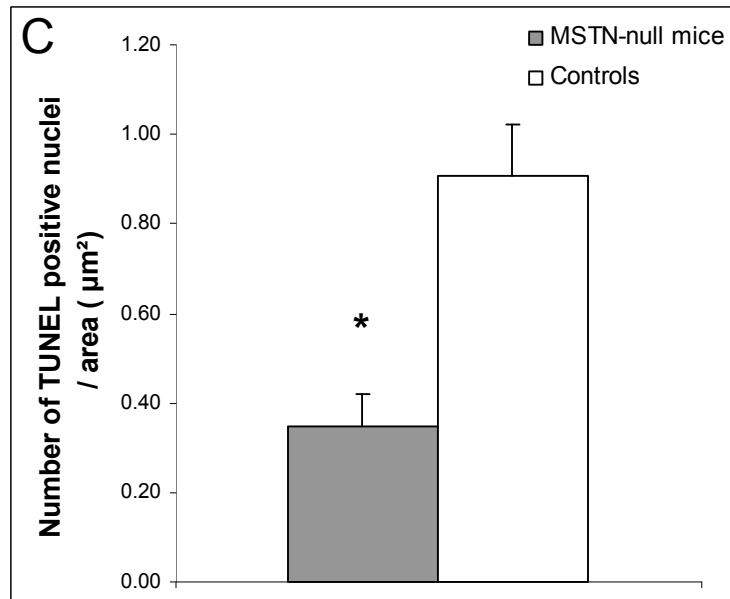
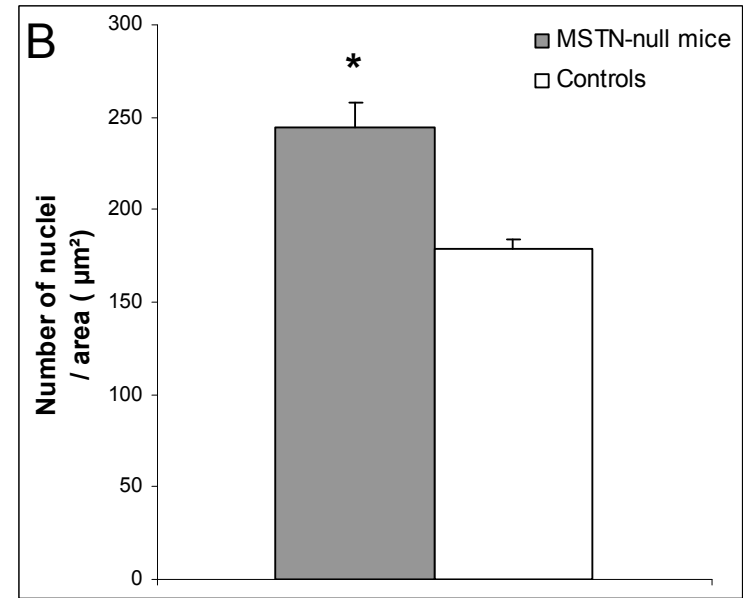
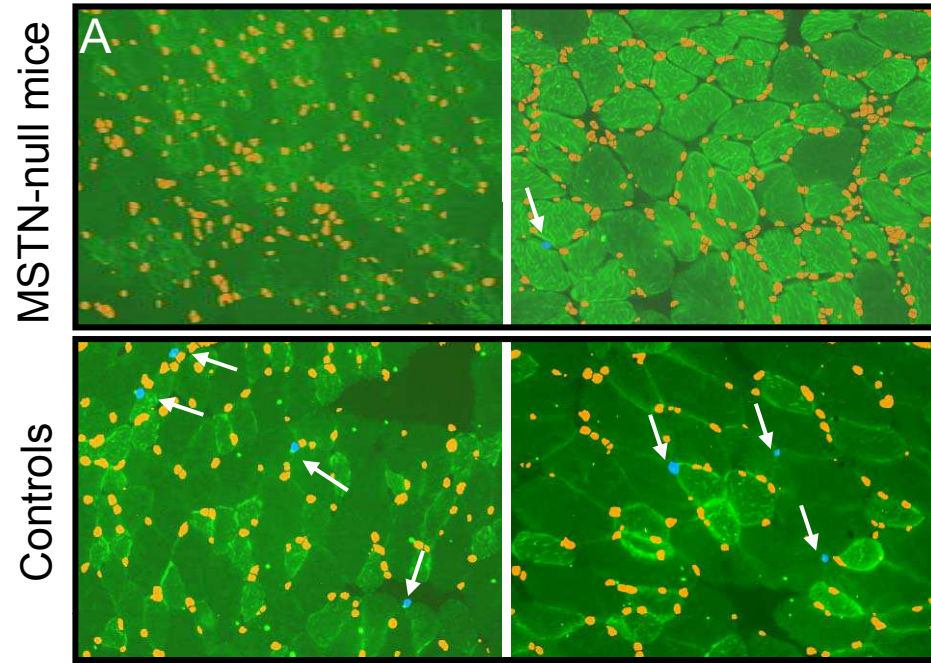


Figure 2

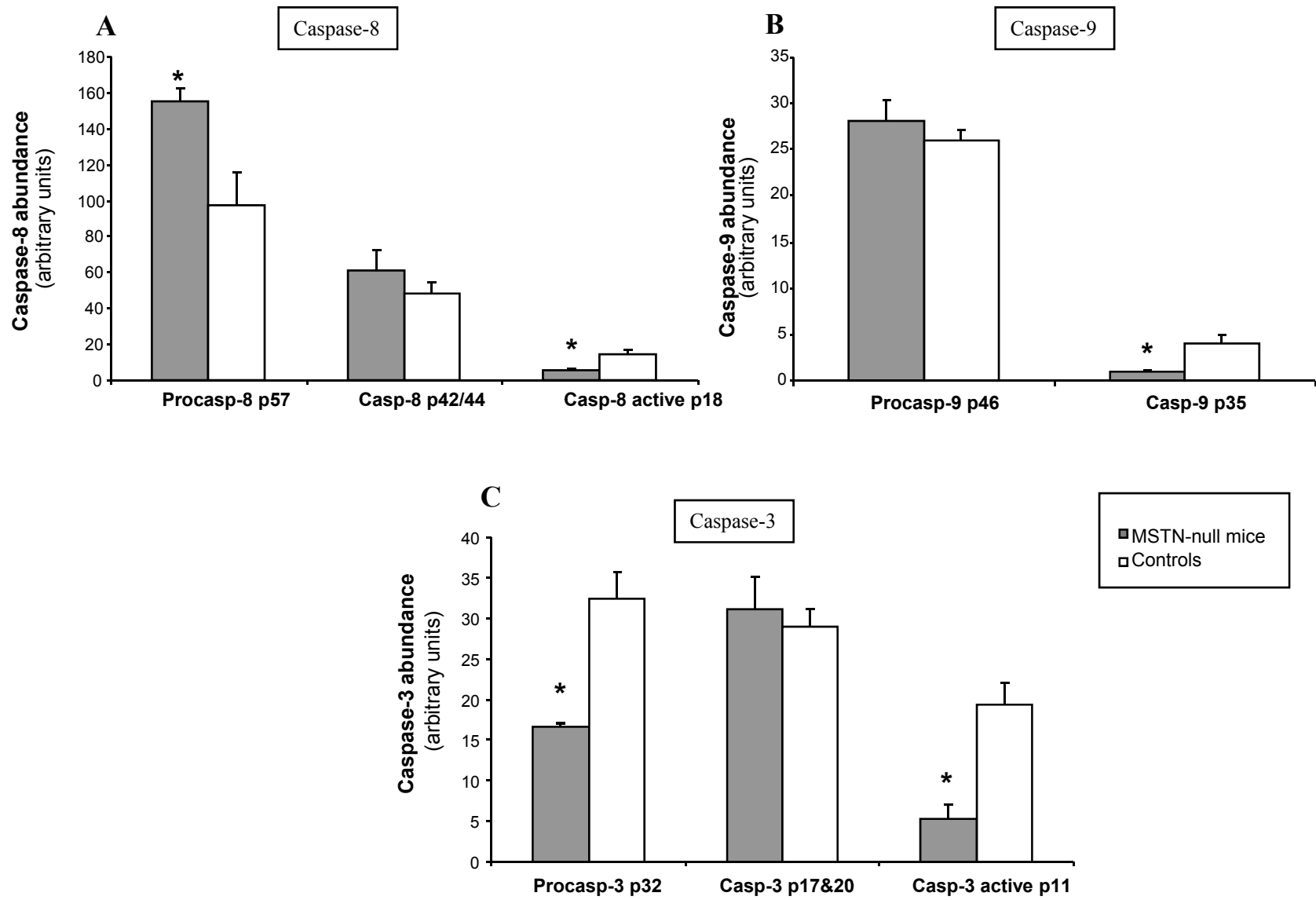


Figure 3

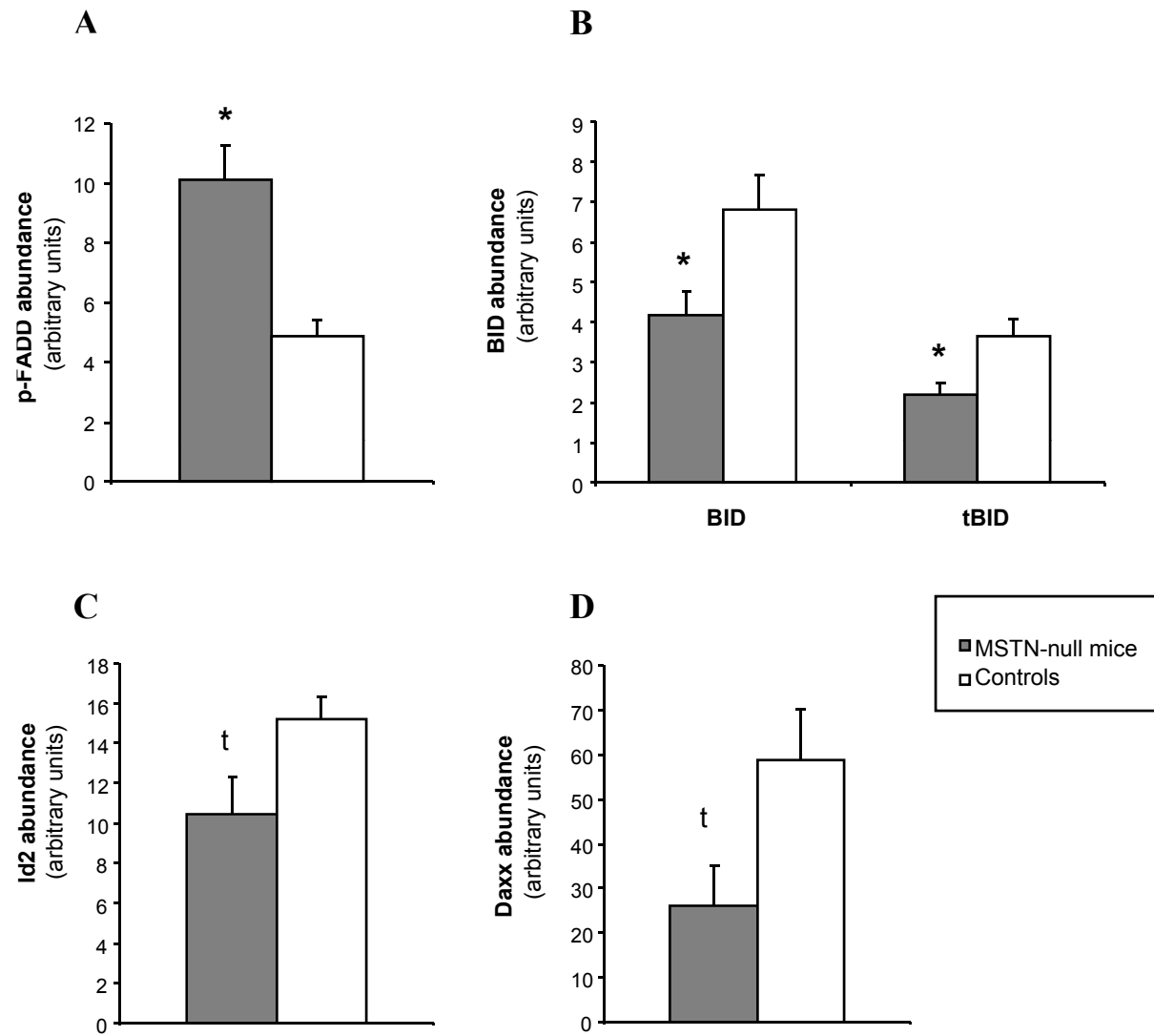
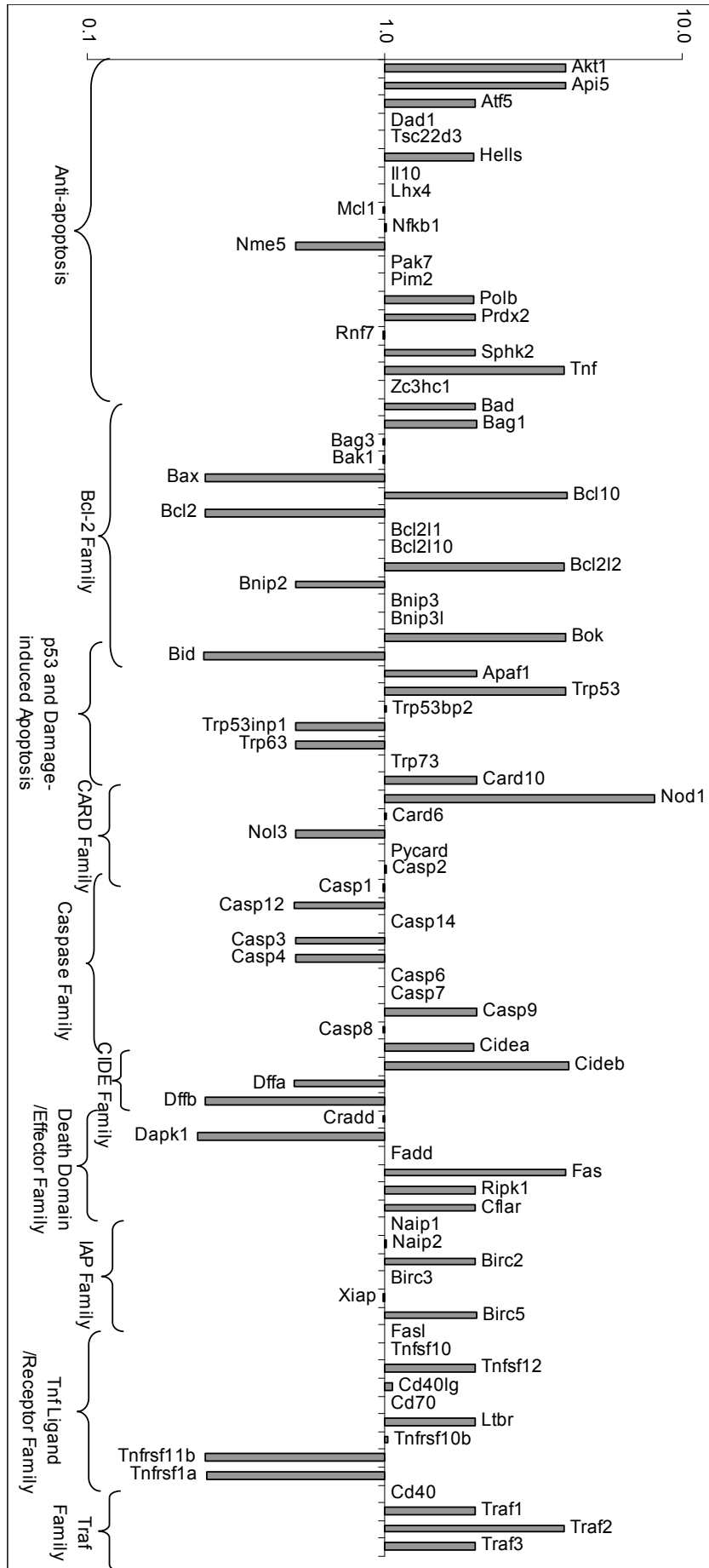
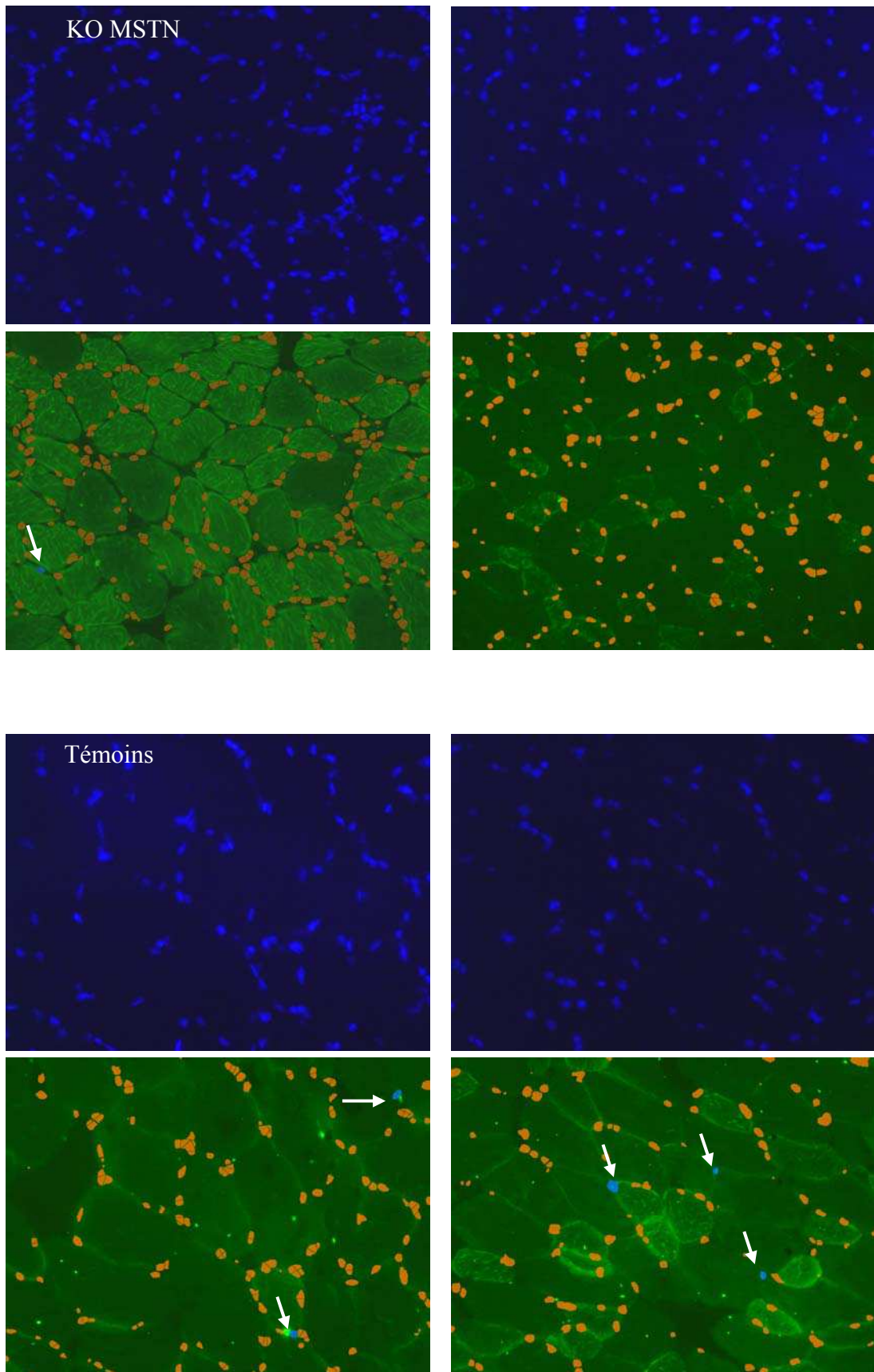


Figure 4

Figure 5





**Figure 27:** Méthode de TUNEL associée à une contre coloration Hoechst pour révéler les noyaux apoptotiques et les noyaux totaux dans le muscle *Quadriceps* des souris de l'étude.

## II.2. Résultats et discussion

Lors de ce deuxième volet de la thèse, j'ai analysé le statut apoptotique dans le muscle *Quadriceps* de souris KO MSTN, chez lesquelles le gène de la myostatine a été invalidé dès la conception, en comparaison de souris sauvages.

Tout d'abord, la méthode de TUNEL associée à une contre-coloration Hoechst des noyaux (figure 27), m'a permis de montrer, d'une part, que *le nombre de noyaux totaux est plus élevé, et d'autre part, que le taux de noyaux apoptotiques est plus faible dans les muscles des souris KO MSTN* en comparaison de ceux de leurs témoins (1,4 ‰ vs 5,1 ‰,  $p < 0,01$ ). Ceci pourrait être responsable d'une augmentation de la taille du domaine nucléo-cytoplasmique et donc de la synthèse protéique, qui contribuerait au phénomène d'hypertrophie musculaire. Ce résultat est original car c'est la première fois qu'une relation est mise en évidence entre l'inactivation de la myostatine et l'apoptose *in vivo*.

Les données de PCR et de Western-blot révèlent une *abondance plus faible des facteurs pro-apoptotiques (Bid, Dffa, Daxx, Id2, Caspase-8, -9 et -3) et de leurs régulateurs ainsi qu'une abondance plus élevée de facteurs anti-apoptotiques (Traf-2, Api5, Bcl2l2) dans les muscles des souris KO MSTN*. Les caspases-8, -9 et -3 font partie d'une famille de protéases à cystéine jouant un rôle clé dans l'induction et l'exécution de l'apoptose (Cohen, 1997). Mes résultats montrent que l'expression et l'abondance de ces trois caspases sont altérées en l'absence de la myostatine. De plus, l'abondance de leurs formes actives est également plus faible dans les muscles de souris KO MSTN. D'autre part, l'abondance d'un substrat (Bid) de caspase-8 et de son régulateur (FADD) est modifiée. En effet, l'abondance de Bid, une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl2 cible de la caspase-8 (Li *et al.*, 1998), est réduite. Le clivage de Bid par la caspase-8 activée génère une forme tronquée (tBid). Or, l'abondance de tBid est plus faible dans les muscles de souris KO MSTN, ce qui est cohérent avec la faible abondance de la forme active de la caspase-8 observée en l'absence de la MSTN. La protéine FADD joue un rôle dans l'activation de la caspase-8 sous sa forme non phosphorylée (Chinnaiyan *et al.*, 1995). Or, mes résultats montrent une abondance plus élevée de la protéine FADD phosphorylée (pFADD) dans les muscles de souris KO MSTN.

De plus, les données de Western-blot montrent une plus faible abondance de deux protéines pro-apoptotiques Daxx et ID2 dans les muscles des souris KO MSTN. Or, la protéine Daxx (Death domain-associated protein 6) interagit directement avec la protéine ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) pour activer la voie JNK (c-Jun N-Terminal kinase) et donc induire l'apoptose (Yang *et al.*, 1997, Chang *et al.*, 1998). Pour sa part, la protéine ID2

**Tableau 2: Expression de 84 gènes clés de l'apoptose chez les souris KO MSTN vs leurs témoins.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Akt1	Apaf1	Api5	Atf5	Bad	Bag1	Bag3	Bak1	Bax	Bcl10	Bcl2	Bcl2l1
B	Bcl2l10	Bcl2l2	Bid	Naip1	Naip2	Birc2	Birc3	Xiap	Birc5	Bnip2	Bnip3	Bnip3l
C	Bok	Card10	Nod1	Card6	Casp1	Casp12	Casp14	Casp2	Casp3	Casp4	Casp6	Casp7
D	Casp8	Casp9	Cflar	Cidea	Cideb	Cradd	Dad1	Dapk1	Dffa	Dffb	Tsc22d3	Fadd
E	Fas	Fasl	Hells	Il10	Lhx4	Ltbr	Mcl1	Nfkb1	Nme5	Nol3	Pak7	Pim2
F	Polb	Prdx2	Pycard	Ripk1	Rnf7	Sphk2	Tnf	Tnfrsf10b	Tnfrsf11b	Tnfrsf1a	Cd40	Tnfsf10
G	Tnfsf12	Cd40lg	Cd70	Traf1	Traf2	Traf3	Trp53	Trp53bp2	Trp53inp1	Trp63	Trp73	Zc3hc1

Représentation de la Plaque de PCR array. En rouge : gènes révélés surexprimés, en vert : les gènes sous exprimés chez les souris KO MSTN vs témoins. Les gènes entourés représentent les gènes dont l'expression a été confirmée par RT-PCR.

(Inhibitor of differentiation-2) serait impliquée dans l'apoptose associée à une atrophie du muscle squelettique (Alway *et al.*, 2003).

*Dans une deuxième étape, l'expression différentielle de 46 gènes clés de l'apoptose a été détectée en utilisant un PCR array commercial dédié à l'apoptose, avec un Fold Change  $FC \geq 2$ . Les gènes codant pour des facteurs anti-apoptotiques, membres de la famille Bcl2 (bcl2l2, bcl10, Bag3) s'avèrent être surexprimés tandis que des gènes impliqués dans la dégradation de l'ADN (Dffa, Dffb, Dapk1) et les facteurs pro-apoptotiques Bid et Bax, membres de la famille Bcl2, sont sous-exprimés (Tableau 2).*

Enfin, cette étude a révélé aussi *une nouvelle cible moléculaire de la myostatine, le facteur Traf-2*, un membre de la famille Traf (TNF-receptor-associated factor). Or, il a été rapporté que des souris Traf2<sup>-/-</sup> ont une faible masse musculaire (Yeh *et al.*, 1997) liant l'expression de ce facteur au développement musculaire. La surexpression de Traf2 dans les muscles de souris KO MSTN suggère que Traf2 aurait un rôle clé dans l'hypertrophie musculaire. En accord avec ces données, l'expression de ce facteur, pourrait donc constituer un nouveau marqueur d'hypertrophie musculaire.

*L'ensemble des résultats de cette étude montre pour la première fois une atténuation de l'apoptose des noyaux dans le muscle hypertrophié en l'absence de MSTN fonctionnelle. L'augmentation du nombre de noyaux pourrait résulter de l'action anti-proliférative de la MSTN au cours de la myogenèse (Walsh, 1997) et de l'inhibition de la perte de noyaux par apoptose. Toutefois, la question de l'origine cellulaire des noyaux résistants à l'apoptose reste ouverte. Il pourrait s'agir de noyaux de cellules satellites ou de fibres musculaires. Ceci pourrait être caractérisé en utilisant des marqueurs spécifiques de ces différents types cellulaires.*





*Article III : Chelsh et al., Soumis à  
"Animal "*



### III. Article n° 3 : Myostatin inactivation induces similar muscle molecular signature in double-muscled cattle than in mice

#### III.1. Introduction à l'article III

Les bovins appelés «culards» diffèrent des bovins conventionnels notamment par une hypertrophie marquée de leur musculature superficielle. Ces animaux sont caractérisés par un rendement élevé en viande, une augmentation du nombre de fibres (notamment des fibres glycolytiques rapides) et une faible teneur en collagène. L'ensemble de ces caractéristiques est favorable à la tendreté de leur viande. Par contre ces animaux possèdent une faible teneur en lipides intramusculaire ce qui est défavorable à la flaveur de leur viande.

L'hypertrophie des bovins culards est causée par une mutation naturelle du gène MSTN situé au niveau du locus mh (BTA2), identifié en 1997 (Grobet *et al.*, 1997, McPherron and Lee, 1997, Smith *et al.*, 1997). Cette mutation génère une forme tronquée de la myostatine ayant pour conséquence une perte de fonction.

Après avoir identifié de nouvelles cibles moléculaires de la myostatine dans le modèle murin KO MSTN, j'ai recherché si ces candidats et les voies biologiques associées étaient retrouvés chez des bovins culards (fœtus et adultes de la lignée INRA95) qui présentent la mutation (Q204X), vs leurs témoins (bovins charolais dépourvus de la mutation). Ceci devait permettre de vérifier notamment l'hypothèse selon laquelle une résistance à l'apoptose participerait à l'hypertrophie musculaire.



*Myostatin inactivation induces similar muscle molecular signature in double-muscling cattle than in mice*

**Ilham Chelh, Brigitte Picard, Jean-François Hocquette and Isabelle Cassar-Malek\***  
INRA, UR1213, Unité de Recherches sur les Herbivores, Equipe Croissance et Métabolisme  
du Muscle, Centre Clermont-Ferrand/Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, FRANCE.

\* **Corresponding author:** [cassar@clermont.inra.fr](mailto:cassar@clermont.inra.fr)

## **Abstract**

Myostatin (MSTN), a member of the TGF-beta superfamily, is a negative regulator of skeletal muscle mass. We have previously shown that the cell survival/apoptosis pathway is a downstream target of myostatin loss-of-function in mice through regulation of the expression or abundance of many survival and apoptotic factors. In this study, we have used western-blot and qPCR analyses to validate these novel downstream targets of MSTN in double-muscled (DM) cattle *vs* their controls including 260-day-old foetuses and adult cows from the INRA95 strain. MSTN loss-of-function in DM foetuses and DM cows resulted in a glycolytic shift of the muscles (e.g. up-regulation of H-MyBP, PGM1 and SNTA1 and down-regulation of H-FABP), activation of cell survival pathway through regulation of some components of the PI3K/Akt pathway (e.g. up-regulation of DJ-1 and Gsk-3 $\beta$ ser9/Gsk-3 $\beta$ total ratio and down-regulation of Pten) and up-regulation of cell survival factors (TCTP, 14-3-3E, Pink1). We also found a lower abundance of pro-apoptotic transcripts and/or proteins (Caspase-3, caspase-8, caspase-9, BID, ID2 and Daxx) and a higher expression of anti-apoptotic transcripts (Traf2 and Bcl2l2) in DM muscles. All together, these results are in favour to activation of cell survival pathway and loss of apoptosis pathway within the muscles of DM animals. Alteration of both pathways may increase myonuclei survival and then alter the myonuclear to cytosolic ratio (protein/DNA) which is **crucial** for protein synthesis. This could contribute to muscle hypertrophy in DM foetuses and DM cows.

**Keywords:** Myostatin, cattle, muscle hypertrophy, apoptosis, cell survival

## Introduction

In cattle Double Muscling (DM), a recessive trait, results in a [generalised](#) hypertrophy of muscles. DM cattle display heavier muscled carcasses that have less fat and bone than conventional ones. They have a higher proportion of lean meat. Their meat is pale, mainly due to increased proportion of white fast-twitch glycolytic fibres, with reduced flavour due to low marbling but with increased tenderness mainly due to the lower collagen content and higher percentage of fast-twitch glycolytic fibres which favours beef ageing and hence tenderness (Ashmore *et al.*, 1974, Uytterhaegen *et al.*, 1994). The DM phenotype is controlled by the *mh* (muscle hypertrophy) gene, mapped to the centromeric end of *B. taurus* chromosome 2. Grobet *et al.*, (Grobet *et al.*, 1997) showed that the myostatin (MSTN) gene maps to the *mh* locus. Mutations disrupting MSTN lead to the DM phenotype in cattle (Kambadur *et al.*, 1997, McPherron and Lee, 1997). DM in European cattle breeds is characterised by allelic heterogeneity and a number of independent natural mutations were observed (Georges *et al.*, 1998). MSTN-null mice generated by gene targeting show a dramatic and widespread increase in skeletal muscle mass with approximately twice as much muscle as normal mice (McPherron *et al.*, 1997a). The primary coding sequence of the MSTN gene is highly conserved among all vertebrates (Rodgers and Weber, 2001) as is the genomic organization (Garikipati *et al.*, 2007). The gene comprises 3 exons and 2 introns and encodes a member of the TGF- $\beta$  family specifically expressed in skeletal muscle (McPherron *et al.*, 1997a). MSTN is a growth factor that binds to activin IIB receptors (Lee, 2004) and recruits Smads 2 and 3. It controls muscle development and growth at crucial stage of development and is responsible for the maintenance of muscle mass by controlling myogenic cells proliferation and differentiation (for a review, see (Joulia-Ekaza and Cabello, 2006). It notably also regulates atrophy and hypertrophy pathways.

Muscular hypertrophy is due to an increase in the number of muscle fibres (hyperplasia) visible [at foetal period and](#) at birth (Gerrard *et al.*, 1991) and to a lesser extent to fibre enlargement (hypertrophy) as shown in mice (McPherron *et al.*, 1997b). The properties of DM muscles appear as soon as during foetal development (Picard *et al.*, 1995), (Deveaux *et al.*, 2001). MSTN expression is detected from 16 days bovine embryos (Kambadur *et al.*, 1997) and is regulated throughout gestation (Deveaux *et al.*, 2003). An increase in the total number of muscle fibres in DM cattle has been observed during the foetal period (Swatland and Kieffer, 1974, Gagnière *et al.*, 2000). This is likely to be the consequence of disinhibition of myoblast proliferation at crucial stage of muscle development (Picard *et al.*, 1998, Thomas



*et al.*, 2000, Deveaux *et al.*, 2001). In addition, muscle contractile and metabolic differentiation of DM fetuses is delayed compared to that of conventional animals (Gagnière *et al.*, 1997) as DM muscles expressed fewer mature myosin heavy chains at the same gestational age during the first two-thirds of foetal life (Picard *et al.*, 1995, Martyn *et al.*, 2004). However, whether the delay of muscle differentiation is strictly related to the initial difference in proliferation or whether it is related to other process has not been elucidated yet.

In an attempt to identify new MSTN targets that may be involved in the regulation of muscle mass, we have recently examined the molecular profiles in the muscles of DM cattle (Bouley *et al.*, 2005, Cassar-Malek *et al.*, 2007) and in MSTN-null mice (Chelh *et al.*, 2009b) vs their controls. In the absence of functional MSTN, we showed a differential expression of genes and proteins related to the muscle energy metabolism (Bouley *et al.*, 2005, Cassar-Malek *et al.*, 2007), extracellular-matrix (Cassar-Malek *et al.*, 2007), and cell survival/anti-apoptotic pathway (Cassar-Malek *et al.*, 2007, Chelh *et al.*, 2009b). The activation of the PI3K/Akt pathway (Chelh *et al.*, 2009b) and of anti-apoptotic processes (Chelh *et al.*, 2009a) are new potential mechanisms to account for muscle hypertrophy since attenuated apoptosis could reduce myonuclei loss by apoptosis, a crucial determinant for muscle protein biosynthesis.

In this study, we have examined the molecular signatures that were revealed in mice in the muscles of fetuses and cows harbouring MSTN loss-of-function (DM animals). We showed that similar mechanisms participate to the development of muscle hypertrophy in cattle than in mice.

## **Material and Methods**

### **Muscle samples**

Three 260-day-old DM fetuses were obtained by artificial insemination of Charolais heifers by transplantation of frozen embryos of INRA95 strain. This strain comprised a mixture of breeds and the transplanted embryos contained around 75% Charolais. Three normal Charolais fetuses, homozygotes for the Q204X mutation, were obtained by artificial insemination of Charolais heifers using Charolais sperm from non-DM sires. After slaughter at the Experimental slaughterhouse of INRA (Theix), the fetuses were collected and the *Semitendinosus* (ST) muscle was excised, snap frozen and stored at -80°C prior to analysis.

Four DM cows from INRA95 strain (homozygotes for the Q-204X mutations) and four controls were bred at the Carneaux the INRA cattle facility (INRA Domaine de la Verrerie 81400 Blaye-les-Mines). There were compared to four cows of the same strain that were not

harbouring the Q-204X mutation. Samples of ST muscle were collected by biopsy, snap frozen and stored at -80°C until analysis.

### **Western blot analysis**

Western-blotting was used to compare the abundance of candidate proteins potential targets of MSTN in the ST of DM *vs* control animals. Thirty µg of proteins were separated by gel electrophoresis using SDS-PAGE for 2h according to Laemmli's method (Laemmli, 1970). After migration, the proteins were transferred onto PVDF transfer membrane Millipore (Dutscher Dominique SAS, France). Membranes were then blocked with 5% non-fat milk in T-TBS 1X buffer (prepared from T-TBS 10X buffer: 113mM Tris-HCl, 87.5mM Tris base, 1.37M NaCl and 0.5% Tween 20) and incubated under gentle agitation overnight at room temperature in the presence of the following primary antibodies: DJ-1, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-DJ-1 antibody (sc 32874, Santa Cruz); MyBP, 1:8000 dilution of purified mouse monoclonal anti-MyBP antibody (3B8H4-MO1, ABNOVA); PGM1, 1: 250 dilution of purified mouse monoclonal anti-PGM1 antibody (H0000 4608-MO1, ABNOVA); TCTP, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-HRF antibody (sc 30124, Santa Cruz); 14-3-3ε, 1:1000 dilution of purified goat polyclonal anti-14-3-3ε protein antibody (sc 1615, Santa Cruz); α-1 syntrophin, 1:250 dilution of purified rabbit polyclonal anti-SNTA1 antibody (sc- 50460, Santa Cruz); H-FABP, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-H-FABP, was a gift from Dr. Jacques Veerkamp and Dr. Herman Van Moerkerk (Dept. Biochemistry, Nijmegen, Netherlands); mortalin, 1:100 dilution of purified mouse monoclonal anti-GRP75 antibody (MAB3584, Clone 419612, R&D systems); PINK1, 1:1000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-PINK1 antibody (sc- 33796, Santa Cruz); GSK-3β, 1:1000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-GSK-3β antibody (sc- 9166, Santa Cruz); GSK-3β (ser9), 1:2000 dilution of purified goat polyclonal anti-p-GSK-3β (Ser9) antibody (sc- 11757, Santa Cruz); PTEN, 1:2000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-PTEN antibody (sc- 9145, Santa Cruz); CASP8, 1: 1000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-CASP8 antibody, was a gift from Dr. Ahmed Ouali (QuaPA unit, INRA Centre Clermont-Ferrand/Theix, France); CASP3, 1: 500 dilution of purified rabbit polyclonal anti-CASP3 antibody (sc-7148, Santa Cruz); CASP9, 1:1000 dilution of purified rabbit polyclonal anti-CASP9 antibody (sc-7885, Santa Cruz); BID, 1:500 dilution of purified rabbit polyclonal anti-BID antibody (sc-11423, Santa Cruz); Id2, 1:250 dilution of purified rabbit polyclonal anti-Id2 antibody (sc-489, Santa Cruz); Daxx, 1:150 dilution of purified mouse monoclonal anti-Daxx antibody (sc- 8043, Santa Cruz); Actin, 1:20000 dilution of purified mouse monoclonal

anti-actin antibody (IgG2a, Clone AC40, Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA).

The specificity of the antibodies was determined in preliminary experiments (data not shown).

The blots were extensively washed with Tris buffer and incubated under gentle agitation with the secondary antibodies (anti-mouse, anti-goat or anti-rabbit IgG combined with conjugated with horseradish peroxidase 1: 20000 dilution) for 1h. The activity of the enzyme was revealed by Enhanced Chemiluminescence kit (Amersham). The Western-blot photographic film was scanned with an Expression 10000XL PRO scanner (Epson) calibrated in optical density. Band volumes were quantified in the images using ImageQuant TL v2003 software (Amersham) and expressed as arbitrary densitometry units.

For each protein, the Fold Change (FC) was calculated as the ratio of protein abundance in DM animals to protein abundance in control animals.

The power analysis (Lenth, 2007) allowed retaining proteins which presented a minimum difference of 50% corresponding to a threshold FC of 1.5 in foetus' groups (n=3 animals per group, individual samples were analysed in replicate) and cows' groups (n=4 animals per group). This is the case for the most data showed in Table 2.

#### Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis

Total RNA was extracted from muscle tissue samples with TRIZOL® reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendation. RNA integrity was checked using Lab Chip Agilent technology, as previously described (Cassar-Malek *et al.*, 2007).

Six genes were selected from the data obtained in MSTN-null mice (Chelh *et al.*, 2009b). The abundance of transcripts was measured by quantitative RT-PCR (qPCR) using SYBR Green I dye. qPCRs were performed using gene-specific primers pairs (Table 1). The  $\Delta\Delta C_t$  (Cycle threshold) method (Wong and Medrano, 2005) was used to analyse the relative change in gene expression between DM foetuses and their controls and between DM cows and their controls (Individual samples were analysed in replicate).  $\Delta\Delta C_t$  value for each sample was calculated as follows:  $\Delta\Delta C_t = (Ct_{Target} - Ct_{Reference})$  in DM animals –  $(Ct_{Target} - Ct_{Reference})$  in control animals. The fold difference for each sample relative to the control sample:  $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ . qPCR experiments were controlled using the TBP as reference gene. Values of  $2^{-\Delta\Delta C_t} > 2$  and  $2^{-\Delta\Delta C_t} < 0.50$  were considered to declare that a transcript was up-regulated and down-regulated respectively.

The power analysis (Lenth *et al.*, 2007) allowed retaining genes which presented a minimum difference of 100% corresponding to a threshold FC of 2.0. This is the case for most data showed in Table 3.

## Statistical analyses

The difference of protein and transcript levels between DM animals and their controls was assessed by the Student *t*-test. Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). A difference between groups was considered significant when  $P < 0.05$ .

## Results

**Muscle energy metabolism.** Western-blot analysis revealed the up-regulation of all proteins related to glycolytic metabolism (Table 2) including myosin-binding protein (H-MyBP), a protein involved in the contractile apparatus, and  $\alpha$ 1-syntrophin (SNTA1), which is a predominant syntrophin isoform in skeletal and cardiac muscle. H-MyBP was highly expressed in the muscles of DM fetuses and DM cows (FC= 1.4;  $p < 0.05$  and FC= 1.8;  $p < 0.05$  respectively). A high SNTA1 protein level was also detected in both DM fetuses and DM cows compared to controls (FC= 2.3;  $p < 0.05$  and FC= 1.3;  $p < 0.05$  respectively). No significant difference in Phosphoglucomutase (PGM) abundance was revealed in the muscles of DM fetuses *vs* controls. There was a tendency to a higher abundance in the muscles of DM cows *vs* controls. **On the contrary**, the abundance of H-FABP was lower in the muscles of DM fetuses and DM cows *vs* controls (FC= -2.0;  $p < 0.1$  and FC= -2.1;  $p < 0.05$  respectively).

**PI3K/Akt signalling pathway.** In agreement with previous data in mice (Chelch *et al.*, 2009b), we analysed the protein expression profiles of some components and regulators of the PI3K/Akt signalling pathway in the muscles of DM fetuses and DM cows, especially Gsk-3 $\beta$ ser9/Gsk-3 $\beta$ total ratio, Pten and DJ-1 (Table 2). The abundance of total GSK-3 $\beta$  tended to decrease in the muscles of both DM fetuses and DM cows. However, the ratio of serine-9 phosphorylated GSK-3 $\beta$ /total GSK-3 $\beta$ , an indicator of GSK-3 $\beta$  inactivation (Grimes and Jope, 2001), was significantly increased only in the muscles of DM cows. This indicated that the inactive form of Gsk-3 $\beta$  was predominant in the absence of active MSTN. Pten protein which is an antagonist of PI3K function, showed a decreased abundance in DM animals *vs* controls (FC = -4.0;  $p < 0.05$  and FC = -3.9  $p < 0.1$ , respectively in fetuses and cows). The abundance of DJ-1, a regulator of the PI3K-Pten pathway, was higher in DM animals *vs* controls (FC= 6.9;  $p < 0.01$  and FC= 1.6;  $p < 0.05$  respectively in DM fetuses and cows).

All together, these data confirmed an activation of the PI3K/Akt signalling pathway in the muscles of DM fetuses and DM cows compared to their controls as previously shown in mice.

**Cell survival pathway.** Moreover, western-blot analysis showed an up-regulation of anti-apoptotic/survival factors such as Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP), and 14-3-3E protein. The abundance of TCTP was higher in both DM foetuses and DM cows *vs* controls (FC = 1.9 and FC = 1.3 respectively;  $p < 0.01$ ). There was a tendency for higher 14-3-3E abundance in the muscles of DM cows *vs* controls (FC = 1.9,  $p < 0.1$ ). The PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), a crucial protein for cell survival, was significantly more abundant in the muscles of DM foetuses and DM cows compared to their controls (FC = 2.8 and FC = 2.0 respectively;  $p < 0.01$ ).

**Apoptotic pathway.** The amount of proteins involved in apoptosis was examined by western-blot including members of the caspase family and other apoptosis regulators (Table 1).

**Caspases.** A lower steady state levels of caspases -3, -8 and -9 playing a central role in the execution of apoptosis was detected in DM animals. A significant decrease was observed for pro-caspase-3 (FC = -1.7;  $p < 0.05$ ) and active caspase-3 (FC = -1.5;  $p < 0.05$ ), pro-caspase-8 (FC = 1.6;  $p < 0.05$ ) and active caspase-9 (FC = -1.6;  $p < 0.05$ ) especially in the muscles of cows harbouring MSTN loss-of-function. Additionally, the levels of caspase-3 and -9 transcripts were checked by real time PCR analysis (Table 3). Caspase-9 mRNA were decreased significantly especially in DM foetuses ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.20$ ,  $p < 0.05$ ), while caspase-3 mRNA was lower in DM cows ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.20$ ,  $p < 0.01$ ).

**Other regulators of apoptosis.** Bid, a Bcl-2 interacting protein, was revealed by western blot as two distinct bands, a 22 kDa and its truncated 14 kDa active form tBID. There were a significant reduction of the p22 content (FC = -1.6,  $p < 0.05$ ) and a tendency to be lower for the truncated form p14 (FC = -4.4,  $p < 0.1$ ). The transcript of Bid was also down-regulated in DM foetuses and DM cows compared to their controls as shown by RT-PCR ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 0.30$  respectively;  $p < 0.05$ ). A decreased abundance of two positive regulators of apoptosis, Id2 (Inhibitor of differentiation-2) and Daxx (Death domain-associated protein 6) was also found. Id2 tended to decrease in DM foetuses (FC = -3.5  $p < 0.1$ ), whereas a significantly decrease was found in the muscles of DM cows (FC = -1.9;  $p < 0.01$ ). Daxx level was significantly decreased in both the muscles of DM foetuses and DM cows (FC = -3.5 and FC = -3.6 respectively;  $p < 0.01$ ). There was only a tendency for decreased GRP75 (mortalin, a member of the heat shock protein 70 family with anti-apoptotic function) abundance, in DM foetuses. Moreover, there was a significant increase in the abundance of two anti-apoptotic transcripts Bcl2l2 (Bcl2-like 2), a member of Bcl2 family, and Traf2, a member of the Traf family, in the muscles of DM animals ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 12.1$  for Bcl2l2 in DM cows and  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 42.6$  and  $2^{-\Delta\Delta Ct} = 3.8$

for Traf2 in DM fetuses and DM cows respectively,  $p < 0.05$ ) excepted for Bcl2l2 in DM fetuses, which tended to be increased ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2.3$ ,  $p < 0.1$ ).

All together, these data indicated that expression of proteins and genes involved in the induction of the apoptotic pathway was decreased while that of those involved in the anti-apoptotic pathway was increased.

## Discussion

In a previous study comparing the molecular profiles in the muscles of MSTN null mice *vs* their controls we have found a differential expression of many genes and proteins related to muscle energy metabolism, activation of PI3K/Akt signalling pathway and cell survival/apoptosis pathway (Chelh *et al.*, 2009b). Herein, we have examined these molecular signatures in the muscles of DM fetuses and DM cows harbouring MSTN loss-of-function.

***Signatures related to muscle energy metabolism and growth.*** As expected (Bouley *et al.*, 2005, Cassar-Malek *et al.*, 2007, Chelh *et al.*, 2009b), our results have revealed a fast glycolytic shift within skeletal muscle in the absence of functional myostatin. We showed an increased abundance of H-MyBP and PGM1 in hypertrophied muscles of DM animals. H-MyBP, a protein involved in the contractile apparatus, is principally associated with fast twitch fibres (Bennett *et al.*, 1986). PGM is a glycolytic enzyme catalyzing the interconversion of glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate. The enzymatic activity of PGM1 is regulated through phosphorylation by p21-activated kinase1 (Pak1). This serine/threonine kinase is needed for various cellular functions such as mitosis, angiogenesis and cell survival (Vadlamudi and Kumar, 2004). In coherence with that H-FABP showed a decreased abundance in both DM fetuses and DM cows *vs* their controls. This protein is a major fatty acid-binding indicator in heart and skeletal muscles which is involved in oxidative metabolism (Hocquette *et al.*, 1998). Additionally, SNTA1, a predominant syntrophin isoform in skeletal and cardiac muscle, is necessary for muscle activity through the regulation of the calcium influx in skeletal muscle (Vandebrouck *et al.*, 2007) (Kurebayashi *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2002). In this study, SNTA1 was significantly higher in both DM fetuses and DM cows. This result is in agreement with (Vandebrouck *et al.*, 2007) who observed a loss of this protein in dystrophic muscle cells. Our result suggests that the abundance of SNTA1 protein may participate in maintaining muscle metabolism and contraction in DM fetuses and DM cows.

**Proteins related to the PI3K/Akt signalling pathway.** The PI3K pathway is a signalling network that promotes cell survival and proliferation and is known to play a role in oncogenic transformation and in prevention of apoptosis (Lin *et al.*, 1999, Chang *et al.*, 2003). Differential expression of some components of this pathway was found in the muscles of DM foetuses and DM cows *vs* their controls. In absence of functional MSTN, DJ-1 (a cancer- and Parkinson's disease -associated protein, also called park7) was increased. This protein protects cells from toxic stresses, is implicated in mitochondria and oxidative stress-related survival pathways (Lev *et al.*, 2006), and is a novel regulator of the PI3K-Pten pathway (Kim *et al.*, 2005). Moreover, in this study, a decreased abundance of Pten, a tumor suppressor phosphatase with tensin homology and antagonist of PI3K function, was detected in DM animals compared to their controls. GSK-3 $\beta$  is a substrate for phosphorylated Akt, has a constitutive activity and is inactivated upon phosphorylation (Stambolic and Woodgett, 1994). We have found a decreased level in the total GSK-3 $\beta$  and an increased level of serine-9 phosphorylated GSK-3 $\beta$ /total GSK-3 $\beta$  ratio especially in the muscles of DM cows which demonstrated inhibition in GSK-3 $\beta$  activity. All of these results are in agreement with a recent study which indicates the crucial role of this pathway in hypertrophy. A study was reported that constitutively active protein kinase B (also known as Akt) increased fibre size (Pallafacchina *et al.*, 2002). Izumiya *et al.*, (2008) recently showed that muscle-specific Akt1 transgene expression led to muscle hypertrophy of type IIB muscle fibers, which was associated with an increase in muscle strength.

The present findings support our previous results that demonstrated an activation of the PI3K/Akt signalling pathway in response to MSTN loss-of-function in mice.

**Proteins related to cell survival pathway.** Interestingly, we also found that the abundance of cell survival/anti-apoptotic factors in DM animals, namely TCTP, 14-3-3E, and PINK1 was increased. TCTP is a crucial factor of cell growth, cell cycle progression, malignant transformation and involved in protection of cells against various stress conditions and apoptosis (Bommer and Thiele, 2004). 14-3-3E, is a member of the 14-3-3 family of phosphoserine-binding adapter molecules that mediate a general survival-promoting function through interaction with target proteins, by enhancing pro-survival signalling while suppressing activity of pro-apoptotic proteins (Porter *et al.*, 2006). PINK1, which encodes a Ser/Thr kinase with a mitochondrial-targeting signal, and collaborate with DJ-1 to protect cells against oxidative stress induced cell death (Tang *et al.*, 2006).

The increased abundance of cell survival factors with anti-apoptotic function could provide a resistance of nuclei to apoptosis. Therefore, there could be fewer nuclei dying by apoptosis in

the muscles. This phenomenon could contribute to increase protein synthesis and thus muscle hypertrophy in DM cattle.

***Genes and proteins related to the apoptotic pathway.*** Our previous genomic data in mice indicated that the cell apoptosis pathway is a downstream target of myostatin loss-of-function through regulation of expression or abundance of many pro- and anti-apoptotic factors (Chelh *et al.*, 2009a). In the present study, we have demonstrated that the absence of functional MSTN is associated with changes in the expression and abundance of genes and proteins involved in the apoptotic pathway. Caspases belong to a family of proteolytic enzymes which play a key role in both the initiation and execution of apoptosis. We detected a lower abundance of caspases-3 and -9 transcripts together with lower levels of active caspase-3, and of active caspase-9, which play respectively an effector and executor role in the apoptosis pathway. The abundance in the procaspase-8 protein was also lowered in agreement to our previous observations in mice (Chelh *et al.*, 2009a). This indicates that the caspase-dependent apoptotic pathway was attenuated in the muscles of DM foetuses and DM cows related to MSTN loss-of-function.

The abundance and the expression of Bid, a pro-apoptotic member of Bcl-2 family and an important substrate of caspase-8 (Li *et al.*, 1998), also differed between muscles of DM foetuses and their controls. Accordingly, the abundance of the truncated form of Bid (tBid), which results from a cleavage by caspase-8, tended to be lower in DM foetuses.

Two regulators of apoptosis (Daxx and Id-2) also tended to be less abundant in both DM foetuses and DM cows compared to their controls. The pro-apoptotic protein Daxx plays a role in the activation of ASK1 which is essential to JNK activation and then apoptosis induction (Yang *et al.*, 1997, Chang *et al.*, 1998). Daxx interacts also with Fas receptor and potentiates its pro-apoptotic action (Yang *et al.*, 1997). The Inhibitor of differentiation-2 (Id2) has been associated with apoptosis-associated atrophy of skeletal muscles (Alway *et al.*, 2003).

Interestingly, we also detected the differential expression of Bcl2l2, an anti-apoptotic member of Bcl2 family. Expression of this gene in cells has been shown to contribute to reduced cell apoptosis and promoting cell survival (Ross *et al.*, 1998, Denisov *et al.*, 2003). Our data show up-regulation of the Bcl2l2 transcript in the muscles of DM foetuses and DM cows *vs* their controls.

Additionally, in DM animals we revealed an increased expression of Traf2, a member of the Traf family that is signal transducers of Tumor Necrosis Factor (TNF) pathway (Arch *et al.*, 1998). Interestingly, Traf2 *-/-* mice are born with severely decreased skeletal muscle mass



indicating that this factor is necessary for normal muscle development (Yeh *et al.*, 1997, Timothy and Antonio, 1998). More recently, Zhang *et al.*, (2009) reported that TRAF2 inhibits TNF $\alpha$ -induced cell death by recruiting anti-apoptotic proteins.

All together, these results are in agreement with our previous study conducted in the context of MSTN inactivation in mice (Chelh *et al.*, 2009a, Chelh *et al.*, 2009b). This work confirms that MSTN loss-of-function in DM animals results in activation of cell survival pathway in muscle through alteration of the activity of PI3K pathway and cell survival factors and of the abundance of apoptotic factors in favour to decreased apoptotic pathway (Figure 1). As previously hypothesised in mice, lower apoptosis within muscle likely promotes myonuclear survival and consequently increases the myonuclear to cytosolic ratio (protein/DNA). This could account for muscle hypertrophy in both DM fetuses and DM cows. **However, the attenuated apoptosis does not likely contribute to the determinism of their meat tenderness conversely to the hypothesis of Ouali *et al.* (2006) in conventional meat producing animals. Indeed, the tenderness would rather be linked the cow collagen content of their muscles (Ashmore *et al.*, 1974, Uytterhaegen *et al.*, 1994).** The existence of similar changes in some biological processes in the muscles of MSTN KO mice (gene inactivation) and DM cattle (loss-of-function mutation) reinforces the biological relevance of the proposed mechanisms of action of this growth factor.

## Acknowledgements

The authors thank members of the Herbivore Research Unit for producing the fetuses, slaughtering the animals and collecting muscle samples, F. M $\acute{e}$ nissier for production of DM fetuses and Q204X genotyping, G Gent $\grave{e}$ s, for excellent technical assistance in molecular biology, A. Delavaud and S. Bes for helpful discussions. Dr A. Ouali (UR370 QuaPA, INRA, Clermont-Ferrand/Theix, FRANCE) for kindly providing the Caspase 8 antibody. The study was granted by ANR (for the MYOTROPHY project: ANR BLAN08-2\_309209).

## References

1. Alway SE, Martyn JK, Ouyang J, Chaudhrai A and Murlasits ZS 2003. Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R540-549.
2. Arch RH, Gedrich RW and Thompson CB 1998. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)-a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes & Development* 12, 2821-2830.

3. Ashmore C, Parker W, Stokes H and Doerr L 1974. Comparative aspects of muscle fibre types in fetuses of the normal and double muscled cattle. *Growth* 38, 501 - 506.
4. Bennett P, Craig R, Starr R and Offer G 1986. The ultrastructural location of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 7, 550-567.
5. Bommer U-A and Thiele B-J 2004. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 379-385.
6. Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF and Picard B 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5, 490-500.
7. Cassar-Malek I, Passelaigue F, Bernard C, Leger J and Hocquette J-F 2007. Target genes of myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses. *BMC Genomics* 8, 63.
8. Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA and McCubrey JA 2003. Involvement of PI3K//Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17, 590-603.
9. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H and Baltimore D 1998. Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by the Adapter Protein Daxx. *SCIENCE* 281, 1860-1863.
10. Chelh I, Meunier B, Picard B, Reecy JM, Hocquette J-F and cassar-Malek I 2009a. Apoptosis is a target of myostatin loss-of-function in mice. Submitted.
11. Chelh I, Meunier B, Picard B, Reecy M, Chevalier C, Hocquette J-F and Cassar-Malek I 2009b. Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets. *BMC Genomics* 10, 196.
12. Denisov AY, Madiraju MSR, Chen G, Khadir A, Beauparlant P, Attardo G, Shore GC and Gehring K 2003. Solution Structure of Human BCL-w: Modulation of ligand binding by the C-terminal helix. *J. Biol. Chem.* 278, 21124-21128.
13. Deveaux V, Cassar-Malek I and Picard P 2001. Comparison of contractile characteristics of muscle from Holstein and Double-Muscled Belgian Blue fetuses. *Comp Biochem Physiol* 131, 21 - 29.
14. Deveaux V, Picard B, Bouley J and Cassar-Malek I 2003. Location of myostatin expression during bovine myogenesis in vivo and in vitro. *Reprod Nutr Dev* 43, 527 - 542.
15. Gagnière H, Picard B, Jurie C and Geay Y 1997. Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-muscled cattle. *Meat Science* 45, 145-152.
16. Gagnière H, Ménissier F, Geay Y and Picard B 2000. Influence of genotype on contractile protein differentiation in different bovine muscles during foetal life. *Ann. Zootech.* 49, 405-423.
17. Garikipati DK, Gahr SA, Roalson EH and Rodgers BD 2007. Characterization of Rainbow Trout Myostatin-2 Genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic Organization, Differential Expression, and Pseudogenization. *Endocrinology* 148, 2106-2115.
18. Georges M, Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Pirottin D and Brouwers B 1998. Positional candidate cloning of the bovine mh locus identifies an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, Australia, January 11-16, 1998. Volume 26: Quantitative genetic theory; selection theory and experiments; internationalisation of breeding programs; detection of quantitative trait loci; exploitation of quantitative trait loci; quantitative trait loci maps; transgenics; developmental genetics.*, 195-202.
19. Gerrard DE, Thrasher KH, Grant AL, Lemenager RP and Judge MD 1991. Serum-induced myoblast proliferation and gene expression during development of double muscled and normal cattle. *Journal of Animal Science* 69, 317.

20. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R and Georges M 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17, 71 - 74.
21. Hocquette JF, Ortigues-Marty I, Pethick D, Herpin P and Fernandez X 1998. Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science* 56, 115-143.
22. Joulia-Ekaza D and Cabello G 2006. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research* 312, 2401-2414.
23. Kambadur R, Sharma M, Smith TPL and Bass JJ 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscling Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Res.* 7, 910-915.
24. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu F-F, Tsao M-S and Mak TW 2005. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 7, 263-273.
25. Lee S-J 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 61-86.
26. Lenth RV 2007. Statistical power calculations. *J. Anim Sci.* 85, E24-29.
27. Lev N, Roncevic D, Ickowicz D, Melamed E and Offen D 2006. Role of DJ-1 in Parkinson's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* 29, 215-225.
28. Li H, Zhu H, Xu C-j and Yuan J 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
29. Lin J, Adam RM, Santiestevan E and Freeman MR 1999. The Phosphatidylinositol 3'-kinase Pathway Is a Dominant Growth Factor-activated Cell Survival Pathway in LNCaP Human Prostate Carcinoma Cells. *Cancer Res* 59, 2891-2897.
30. Martyn JK, Bass JJ and Oldham JM 2004. Skeletal muscle development in normal and double-muscling cattle. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 281A, 1363-1371.
31. McPherron AC and Lee S-J 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 12457-12461.
32. McPherron AC, Lawler AM and Lee S-J 1997a. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
33. McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ 1997b. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83 - 90.
34. Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L and Sentandreu MA 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* 74, 44-58.
35. Picard B, Depreux F and Geay Y 1998. Muscle differentiation of normal and double-muscling bovine foetal myoblasts in primary culture. *Basic Appl Myol* 8, 197 - 203.
36. Picard B, Gagnière H, Robelin J and Geay Y 1995. Comparison of the foetal development of muscle in normal and double-muscling cattle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 16, 629-639.
37. Porter GW, Khuri FR and Fu H 2006. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Seminars in Cancer Biology* 16, 193-202.
38. Rodgers BD and Weber GM 2001. Sequence conservation among fish myostatin orthologues and the characterization of two additional cDNA clones from *Morone saxatilis* and *Morone americana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 129, 597-603.
39. Ross AJ, Waymire KG, Moss JE, Parlow AF, Skinner MK, Russell LD and MacGregor GR 1998. Testicular degeneration in Bclw-deficient mice. *Nat Genet* 18, 251-256.

40. Stambolic V and Woodgett JR 1994. Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem. J.* 303, 701-704.
41. Swatland HJ and Kieffer NM 1974. Fetal development of the double muscled condition in cattle. *J Anim Sci* 38, 752 - 757.
42. Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, Zhu Z, Ma H, Pan Q, Xia J-h, Xia K and Zhang Z 2006. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1816-1825.
43. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R 2000. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 40235-40243.
44. Timothy KM and Antonio G 1998. TRAF2 expression in differentiated muscle. *Journal of Cellular Biochemistry* 71, 461-466.
45. Uytterhaegen L, Claeys E and Demeyer D 1994. Effects of exogenous protease effectors on beef tenderness development and myofibrillar degradation and solubility. *J. Anim Sci.* 72, 1209-1223.
46. Vadlamudi RK and Kumar R 2004. P21-Activated Kinase 1: An Emerging Therapeutic Target. In *Molecular Targeting and Signal Transduction*, pp. 77-88.
47. Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J, Balghi H, Sebillé S, Kitzis A, Raymond G, Cognard C, Bourmeyster N and Constantin B 2007. Regulation of capacitative calcium entries by  $\alpha$ 1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of  $\alpha$ 1-syntrophin. *FASEB J.* 21, 608-617.
48. Wong ML and Medrano JF 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75-85.
49. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY and Baltimore D 1997. Daxx, a Novel Fas-Binding Protein That Activates JNK and Apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.
50. Yeh W-C, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV and Mak TW 1997. Early Lethality, Functional NF- $\kappa$ B Activation, and Increased Sensitivity to TNF-Induced Cell Death in TRAF2-Deficient Mice. *Immunity* 7, 715-725.
51. Zhang L, Blackwell K, Thomas GS, Sun S, Yeh W-C and Habelhah H 2009. TRAF2 Suppresses Basal IKK Activity in Resting Cells and TNF $\alpha$  Can Activate IKK in TRAF2 and TRAF5 Double Knockout Cells. *Journal of Molecular Biology* 389, 495-510.

**Table 1. Primer sequences used in quantitative real-time PCR.**

Gene Symbol	Forward primer	Reverse primer
CASP3	TCAGTCAGTCAGTTGGGCAC	CGCATTCTTTTCCTGAAGC
CASP9	GTTCCATTGACGAGCCAGAT	CTGCTCAAAAATGCTGTCCA
BID	GAGTGCCACCTCACCATTTT	GCTTCTGGGTGACTTTCAGG
Traf2	ATCGCTACTGCTCCTTCTGC	AGCTGCTCTCCAGGATTGAG
Bcl2l2	CATTGGTTTTCCACCTGCTT	GAGCTGTTCTGTTTGAGGGC
IGF2	CTCCTGGTGCCGAAGGTG	GGACAGAAGCATCACGGAGT
TBP	TCTATTCTGGAGGAGCAG	CAAGGACGACTGCTGGAC

All primer sequences were designed with the Primer3 software ([ref site](#)).

CASP3: caspase-3; CASP9: caspase-9; BID: Bcl-2 interacting protein; Traf2: Tnf receptor-associated factor 2; Bcl2l2: Bcl2-like 2; IGF2: insulin growth factor 2; TBP: Tata box binding protein.

**Table 2: Differential abundance of putative myostatin targets in DM foetuses and DM cows vs their controls.**

		260-day-old DM foetuses vs their controls (n=3)	DM vs their controls (n=4)	Cows
		Fold Change (FC)		
	<b>MYBPH</b>	1.4 *	1.8 *	
<b>Energy metabolism</b>	<b>SNTA1</b>	2.3 *	1.3 *	
	<b>FABPH</b>	-2.0 t	-2.1 **	
	<b>PGM</b>	1.1 NS	2.2 t	
	<b>DJ-1</b>	6.9 ***	1.6 *	
<b>PI3K pathway</b>	<b>GSK3<math>\beta</math>total</b>	-1.8 t	-1.9 t	
	<b>GSKser9/GSKtotal</b>	3.5 NS	3.4 *	
	<b>Pten</b>	-4.0 *	-3.9 t	
<b>Survival factors</b>	<b>TCTP</b>	1.9 *	1.3 *	
	<b>1433E</b>	1.5 NS	1.9 t	
	<b>PINK1</b>	2.8 *	2.0 *	
	<b>CASP3</b>	-1.3 NS	-1.7 *	
	<b>CASP3 active form</b>	-1.4 t	-1.5 *	
	<b>CASP8</b>	-3.9 t	-1.6 *	
	<b>CASP9 active form</b>	-2.3 t	-1.6 *	
<b>Apoptotic factors</b>	<b>BID</b>	-1.6 *	-1.0 NS	
	<b>tBID</b>	-4.4 t	-1.1 NS	
	<b>ID2</b>	-1.1 t	-1.9 **	
	<b>Daxx</b>	-3.5 **	-3.6 **	
	<b>GRP75</b>	-3.2 t	-1.5	

Results are expressed as Fold Changes and the differences have been declared significant by a Student's *t*-test: <sup>t</sup> P < 0.10; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 except for no significant differences (<sup>NS</sup>: P > 0.10).

MyBP-H: Myosin binding protein H; SNTA1: Alpha-1-syntrophin; H-FABP: Heart-fatty acid binding protein H; PMG: Phosphoglucomutase; DJ-1: Cancer- and Parkinson's disease-associated protein (park7); GSK-3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; GSK-3 $\beta$  (ser9): Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (phosphorylated at serine 9); Pten: Tumour-suppressor phosphatase with tensin homology; TCTP: Translationally controlled tumor protein; 14-3-3E: 14-3-3 $\epsilon$  protein;

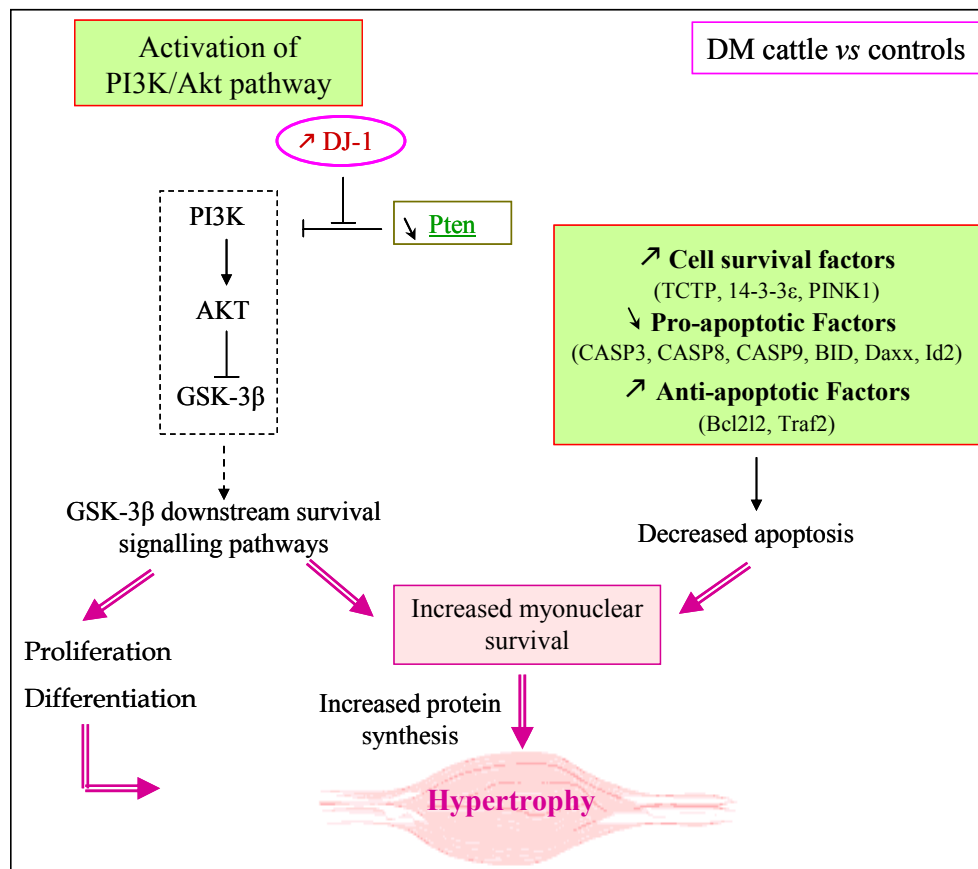
PINK1: PTEN-induced putative kinase 1; CASP3: caspase-3; CASP9: caspase-9; BID: Bcl-2 interacting protein; ID2: Inhibitor of differentiation-2; Daxx: Death domain-associated protein 6; GRP75: Mortalin.

**Table 3: Differential expression of genes related to apoptosis and IGF2 gene confirmed by real time PCR analysis in DM fetuses and cows vs their controls.**

Gene	Animals	DM animals		Control animals		Fold difference	Fold Up- or Down-Regulation
		$\Delta C$ sample - $\Delta C$ reference -	$\Delta \Delta C_t$	$\Delta C$ sample - $\Delta C$ reference -	$\Delta \Delta C_t$		
CASP3	Foetuses	5.133	1.443	3.690	0.4	-2.7 NS	
	Cows	6.713	2.556	4.157	0.2	-5.9 **	
CASP9	Foetuses	4.676	2.383	2.293	0.2	-5.2 *	
	Cows	5.940	1.7	6.665	1.7	1.7 NS	
BID	Foetuses	1.907	0.3	0.058	0.3	-3.6 *	
	Cows	3.432	0.7	2.909	0.7	-1.4 NS	
Traf2	Foetuses	0.698	42.6	6.111	42.6	42.6 *	
	Cows	2.668	3.8	4.608	3.8	3.8 *	
Bcl2l2	Foetuses	2.853	2.3	4.055	2.3	2.3 t	
	Cows	1.524	12.1	5.125	12.1	12.1 *	

Results are expressed as Fold difference and for data interpretation (Fold up- or down-regulation) the absolute  $\Delta \Delta C_t$  values were used. The mean of Ct values in each condition was calculated (data no shown) and the differences have been declared significant by a Student's *t*-test: <sup>t</sup> P < 0.10; \* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 except for no significant differences (<sup>NS</sup>: P > 0.10).

**Figure 1. In the muscles of DM cattle vs their controls, regulators of the PI3K pathway and cell survival/ apoptosis contribute to muscle hypertrophy.**



*PI3K signalling pathway* : PI3K, Phosphatidyl Inositol 3 Kinase; Akt, protein kinase B; GSK-3 $\beta$ , Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ; Pten, tumour-suppressor phosphatase with tensin homology (the most important negative regulator of the cell survival signalling initiated by PI3K); DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease -associated protein (a novel regulator of the PI3K-PTEN pathway). *Survival/Anti-apoptotic factors*: PINK1, PTEN-induced putative kinase; TCTP, Translationally controlled tumour protein; 14-3-3E, 14-3-3 protein epsilon. *Apoptotic factors*: CASP3: caspase-3; CASP9: caspase-9; BID: Bcl-2 interacting protein; BID: Bcl-2 interacting protein; Id2: Inhibitor of differentiation-2; Daxx: Death domain-associated protein 6; Traf2: Tnf receptor-associated factor 2; Bcl2l2: Bcl2-like 2.



**Tableau 3: Expression différentielle de IGF2 validée par qPCR.**

**A**

Gène	Bovins	Bovins culards	Bovins témoins	$\Delta\Delta Ct$	Fold difference
		$\Delta Ct$ échantillon - $\Delta Ct$ référence	$\Delta Ct$ échantillon - $\Delta Ct$ référence		
IGF2	Fœtus	-2.018	-0.724	-1.293	2.5 t
	Vaches	3.322	5.547	-2.225	4.7 *

Gène	Animaux	Fœtus	Vaches	$\Delta\Delta Ct$	Fold difference
		$\Delta Ct$ échantillon - $\Delta Ct$ référence	$\Delta Ct$ échantillon - $\Delta Ct$ référence		
IGF2	Bovins culards	-2.018	3.322	-5.340	40.5 ***
	Bovins témoins	-0.724	5.547	-6.272	77.3 ***

**B**

	Fœtus témoins	Fœtus culards	Vaches témoins	Vaches culards
Fœtus témoins		0,065299	0,000072	
Fœtus culards	0,065299			0,000003
Vaches témoins	0,000072			0,010934
Vaches culards		0,000003	0,010934	

La moyenne des valeurs de Ct dans chaque condition a été calculée.

A : Les différences sont déclarées significatives par le test *t*-Student si <sup>t</sup> p < 0.10; \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

B : Les différences sont déclarées significatives par Anova si *p*-value < 0.05

Les deux tests statistiques montrent :

- une différence significative entre les vaches culardes et les fœtus culards
- une différence significative entre les vaches culardes et les vaches témoins.
- une différence significative entre les vaches témoins et les fœtus témoins.
- pas de différence significative entre les Fœtus culards et les Fœtus témoins.

### III.2. Résultats et discussion

La présente étude a consisté à valider l'ensemble des résultats obtenus chez des souris KO MSTN (un modèle où le gène de la myostatine est complètement absent) dans le modèle Bovin «culard» caractérisé par une mutation naturelle 'perte de fonction' dans ce gène.

Les différences dans l'expression et l'abondance des candidats pour constituer des cibles de la MSTN ont été validées par Western-blot et/ou qPCR entre des bovins culards fœtus et adultes vs leurs témoins. L'ensemble des données présentées dans la publication 3 est en accord avec les résultats obtenus dans le modèle murin. Tout d'abord, *elles ont confirmé l'orientation glycolytique du métabolisme énergétique des muscles des bovins culards en réponse à la perte de fonction de la myostatine*. Ceci a été caractérisé par l'augmentation de l'abondance des protéines H-MyBP, PGM1, SNTA1 et la baisse de l'abondance de la H-FABP, une protéine liée aux acides gras et associée au métabolisme oxydatif (Hocquette *et al.*, 1998). De plus, *la comparaison des muscles culards et de ceux de leurs témoins a confirmé l'activation de la voie PI3K* comme illustré par l'augmentation du taux de la GSK-3 $\beta$  phosphorylée (forme inhibée), l'augmentation de l'abondance de la protéine DJ-1 (un activateur indirect de la voie PI3K/Akt) et la faible abondance de la protéine Pten (un régulateur négatif de voie la voie PI3K/Akt). De même, *une augmentation de l'abondance des facteurs de survie cellulaire*, notamment des protéines TCTP, PINK1 et 14-3-3 $\epsilon$  (à action anti-apoptotique) a été observée dans les muscles des bovins culards vs ceux de leurs témoins.

*Cette étude révèle également des changements dans l'expression des facteurs clés impliqués dans l'apoptose*, similaires à ceux détectés chez les souris KO MSTN. En effet, les données de PCR et de Western-blot montrent une expression et/ou une abondance faible des facteurs pro-apoptotiques en particulier les caspases -3, -8 et -9, BID, ID2 et Daxx et une surexpression des facteurs anti-apoptotiques Bcl2l2 et Traf2. La surexpression de ce dernier facteur suggère qu'il pourrait bien constituer un marqueur d'hypertrophie musculaire également chez les Bovins.

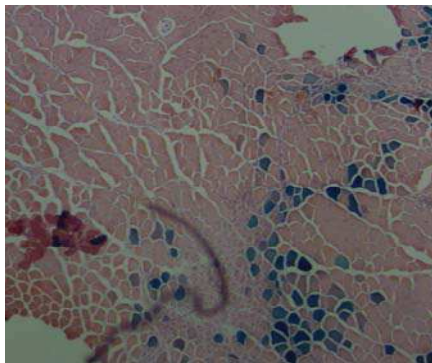
Un autre résultat intéressant de cette étude, qui ne figure pas dans la publication, concerne l'expression du facteur de croissance IGF2 (Insulin Growth Factor 2). L'analyse par PCR du transcrit IGF2 indique que ce facteur est surexprimé dans les muscles des fœtus par rapport à ceux adultes (tableau 3). Ceci est en accord avec Han *et al.* (1987) décrivant IGF2 comme un facteur de croissance important pour le développement fœtal. De plus, ce facteur de croissance est surexprimé chez les bovins culards vs les bovins normaux, en accord avec les



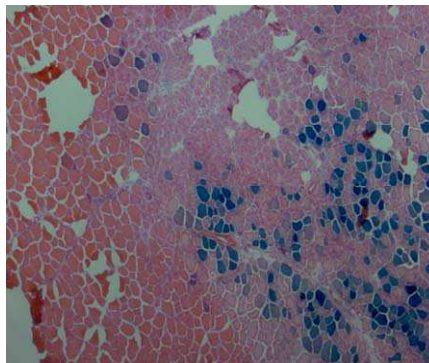
*Développement d'un modèle de la  
surexpression de MSTN in vivo*

**Tableau 4:** Différents paramètres électriques testés pour l'électrotransfert d'un vecteur  $\beta$ -galactosidase dans le *Tibialis anterior* de souris.

N° de souris	Nombre de pulses	Type de pulses	Temps de pulses	Intensité du courant	Temps de repos
IC7	500	courts	100 $\mu$ s	50 mA	900 ms
IC8	500	courts	100 $\mu$ s	100 mA	900 ms
IC9	6	longs	20 ms	25 mA	980 ms
IC10	6	longs	20 ms	50 mA	980 ms



Souris IC7



Souris IC 10

**Figure 28:** Coloration H.E.S (Hemalun, Eosine, Safran) et révélation de l'activité  $\beta$ -galactosidase (en bleu) sur coupes de *Tibialis anterior* de souris après électrotransfert.



**Figure 29:** Aspect des muscles *Tibialis anterior* droit (témoins) et gauche (MSTN) prélevés 7 jours après l'électrotransfert.

Afin de confirmer le rôle de la myostatine dans les différentes voies de signalisation révélées dans ce travail de thèse, il a été envisagé d'utiliser un modèle de surexpression de myostatine *in vivo*. Il s'agit d'un modèle murin dans lequel le muscle *Tibialis anterior* a subi un électrotransfert de la MSTN et présente une atrophie (Durieux *et al.*, 2007). Ce modèle devrait permettre de vérifier si les différentes cibles de l'inactivation de la myostatine sont aussi des cibles de la surexpression de la MSTN. Cette partie de mon travail de thèse a été réalisée en collaboration avec le Dr. Damien Freyssenet du laboratoire de Physiologie et Physiopathologie de l'Exercice et du Handicap de la Faculté de Médecine de Saint-Etienne. Elle s'insère dans le programme ANR MYOTROPHY.

Les conditions habituellement utilisées dans cette équipe pour réaliser l'électrotransfert de gène chez le Rat (Durieux *et al.*, 2007) ont été adaptées au modèle Souris. Dans ce but, j'ai testé différents paramètres électriques pour obtenir la meilleure efficacité d'électrotransfert avec un vecteur  $\beta$ -galactosidase (Tableau 4). La condition '6 pulses longs de 20 ms et 50 mA avec un temps de repos de 980ms' a été retenue car elle permet d'obtenir la meilleure efficacité d'électrotransfert (16%) (Figure 28).

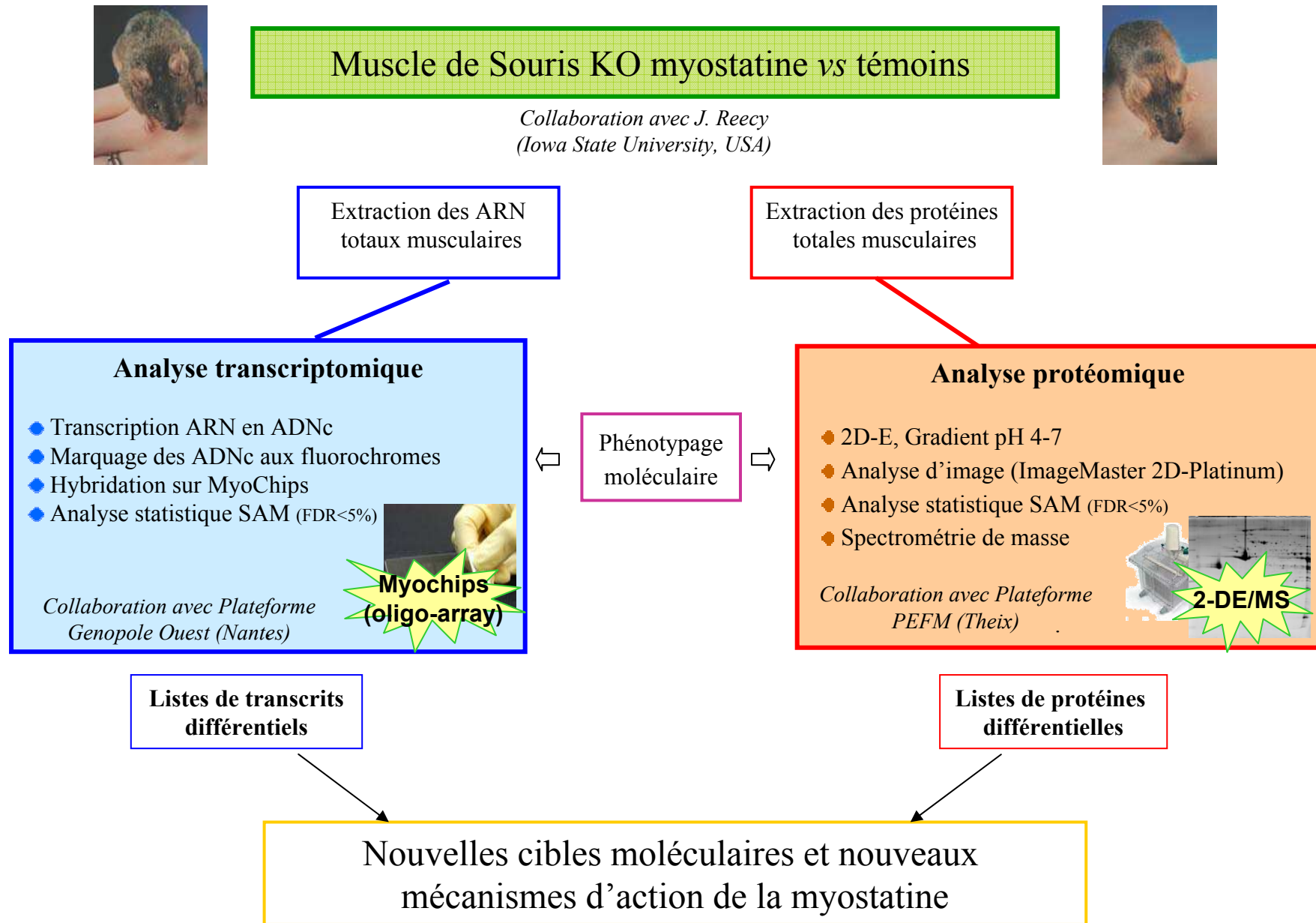
Une fois ces conditions mises au point, 23 souris ont subi, sous anesthésie, un électrotransfert de gène dans le muscle *Tibialis Anterior*. Une injection de plasmide pcDNA3.1-Zeo contenant le gène MSTN a été réalisée dans le muscle de la patte droite, tandis qu'une injection d'un plasmide témoin pCMV- $\beta$ -galactosidase a été réalisée dans le muscle controlatéral. Trente seconde après injection, 3 trains d'impulsions électriques ont ensuite été appliqués. Après 8 jours, les muscles *Tibialis anterior* des souris ont été prélevés sous anesthésie et congelés en vue d'analyse en histologie (n=10) ou en biologie moléculaire (n=13). Lors du prélèvement, l'atrophie des muscles surexprimant MSTN était observable visuellement en comparaison des muscles témoins (figure 29). Les muscles n'ont cependant pas été pesés avant leur congélation immédiate mais pourront l'être avant leur utilisation. L'analyse des prélèvements sera réalisée dans le programme MYOTROPHY.

*Ce modèle permettra d'analyser les niveaux d'expression des candidats impliqués dans les voies cibles de la myostatine telles que la voie PI3K/Akt, la voie Wnt et l'apoptose.*



*Discussion générale,  
Perspectives & Conclusion*





**Figure 30:** Originalité de la démarche suivie au cours de mes travaux de thèse.

Utilisation de deux approches de génomique fonctionnelle (analyse transcriptomique et analyse protéomique) pour révéler les cibles moléculaires de la myostatine par révélation de transcrits et de protéines dont l'expression et l'abondance sont différentes entre les muscles de souris KO MSTN et leurs témoins.

Comme il a été exposé au début de ce manuscrit, l'objectif de mes travaux de thèse était de compléter les connaissances sur les cibles moléculaires de la myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire chez la Souris et le Bovin. La stratégie retenue pour cela a tout d'abord consisté à utiliser un modèle murin d'hypertrophie musculaire (McPherron et al., 1997), caractérisé par une inactivation (KO constitutif) du gène MSTN (invalidation du gène dès la conception).

L'utilisation de deux approches de la génomique fonctionnelle (transcriptomique et protéomique) dans ce modèle a permis d'apporter des éléments nouveaux sur la compréhension des mécanismes d'action de la myostatine. En effet, les données issues de ces approches ont révélé des transcrits et des protéines dont l'abondance était différentielle entre souris KO MSTN et leurs témoins. Ces signatures moléculaires ont permis de dégager des cibles potentielles de la myostatine (Publication 1). Ces cibles potentielles ont ensuite fait l'objet d'une validation par des techniques de références (Western-blot et qPCR). Dans un deuxième temps, l'existence d'une modulation de l'apoptose dans les muscles de souris KO MSTN a plus particulièrement été recherchée. Enfin, l'expression et l'abondance des différentes cibles de la myostatine identifiées dans le modèle murin ont été analysées chez les bovins culards en comparaison de bovins témoins. Ceci a permis de confirmer leur expression différentielle dans un autre modèle d'hypertrophie lié à la perte de fonction de la myostatine. Je discuterai tout d'abord de l'originalité de l'utilisation de deux approches de génomique fonctionnelle pour caractériser les profils protéomique et transcriptomique associés à la perte de fonction de la myostatine. Ensuite, les nouveaux résultats obtenus au cours de ce travail seront discutés. Les perspectives ouvertes par ce travail afin de compléter les données sur les mécanismes d'action de la myostatine seront présentées au fur et à mesure de la discussion.

## I. Utilisation de deux approches de génomique fonctionnelle complémentaires

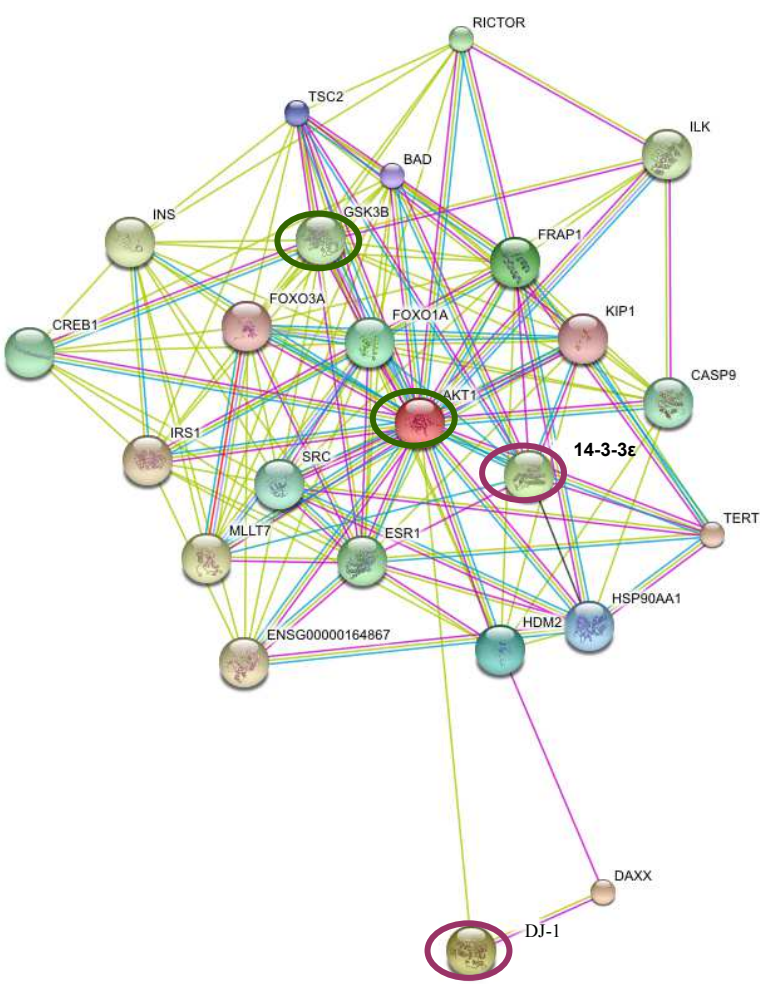
L'originalité de ce travail repose sur l'utilisation de deux approches de génomique fonctionnelle pour révéler des cibles moléculaires de la myostatine. Il s'agissait là d'une démarche sans *a priori* permettant de réaliser un "phénotypage moléculaire" des muscles hypertrophiés en réponse à l'inactivation de la myostatine (figure 30).



L'approche protéomique permet d'analyser le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines présentes dans un tissu et de le comparer à celui d'un autre tissu présentant un phénotype différent par exemple. Dans ce travail, l'utilisation de la protéomique a été utile pour établir une liste de protéines différentiellement exprimées entre les deux contextes biologiques c'est-à-dire en absence et en présence de myostatine fonctionnelle. Cette approche s'appuie sur l'électrophorèse bidimensionnelle, l'analyse des gels et l'identification des protéines par spectrométrie de masse. Elle a demandé 6 mois de réalisation et a été suivie par une analyse bioinformatique des données.

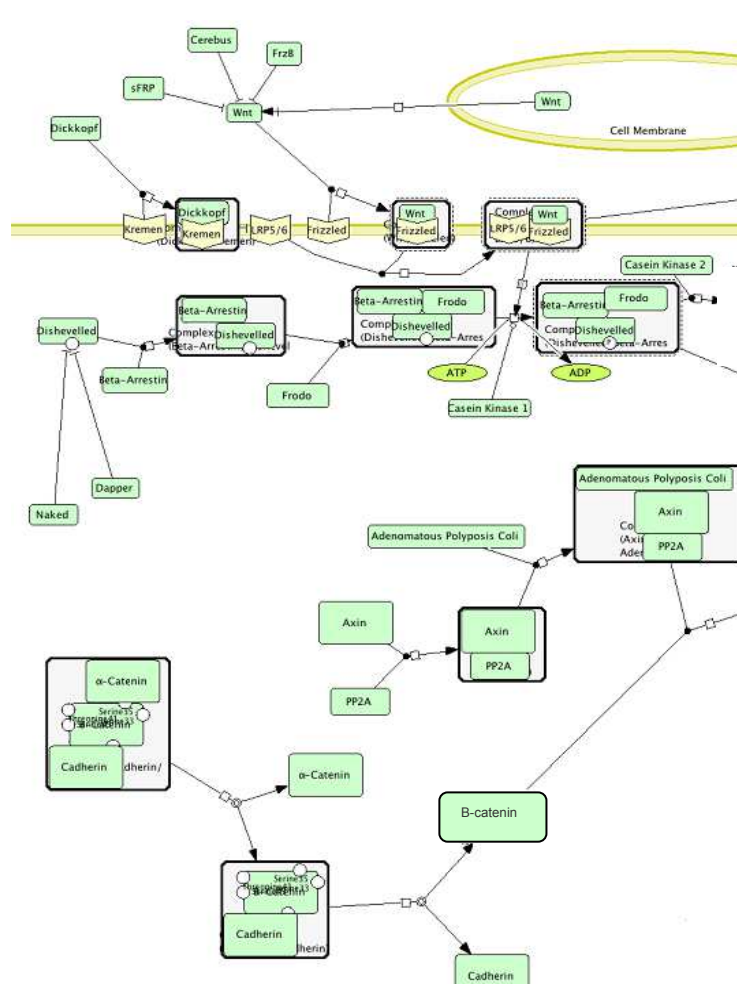
L'analyse protéomique a révélé un nombre restreint de protéines différentiellement exprimées entre les deux groupes d'animaux. Ceci est surprenant dans le contexte de l'inactivation d'un gène qui est associée à une hypertrophie marquée et à des caractéristiques particulières des muscles. Plusieurs interprétations, découlant des contraintes méthodologiques que j'ai respectées, peuvent être avancées pour expliquer cet accès limité aux protéines. Dans cette étude, l'isoélectrofocalisation des protéines a été réalisée sur un gradient acide de pH 4-7. Cette gamme est restreinte mais elle permet d'obtenir une résolution satisfaisante avec une meilleure focalisation des spots protéiques sans empêcher la co-migration de certains spots qui présentent des pI identiques (Bouley *et al.*, 2004). Ceci est plus délicat avec le pH 4-11, raison qui m'a incitée à ne pas utiliser ce gradient. Le gradient de pH acide m'a permis d'accéder à une série de protéines appartenant principalement à l'appareil contractile mais également à certains enzymes du métabolisme énergétique ainsi qu'à des protéines de shock thermique et facteurs de survie. Toutefois, pour avoir une vision complète du protéome musculaire, il aurait été souhaitable de combiner deux gradients de pH étroits, c'est-à-dire le gradient acide de pH 4-7 et le gradient basique de pH 7-11. L'utilisation de ce dernier m'aurait permis de visualiser d'autres protéines des voies métaboliques, en particulier celles liées à la glycolyse. Ceci n'a pas été réalisé dans le temps consacré à la thèse.

Une autre explication au nombre faible des protéines d'intérêt provient sans doute également de la forte abondance des protéines majoritaires dans le tissu musculaire comme l'actine ou la myosine. Celles-ci génèrent en effet des artéfacts de migration pour d'autres protéines plus faiblement représentées dans les extractions musculaires. Par exemple, la liste de protéines n'a révélé aucun facteur de croissance, notamment pas la myostatine. Une extraction plus ciblée pourrait permettre d'accéder aux protéines peu abondantes (facteurs de croissance) et/ou aux constituants de la matrice extracellulaire (Rabilloud, 2009). Ceci pourrait être



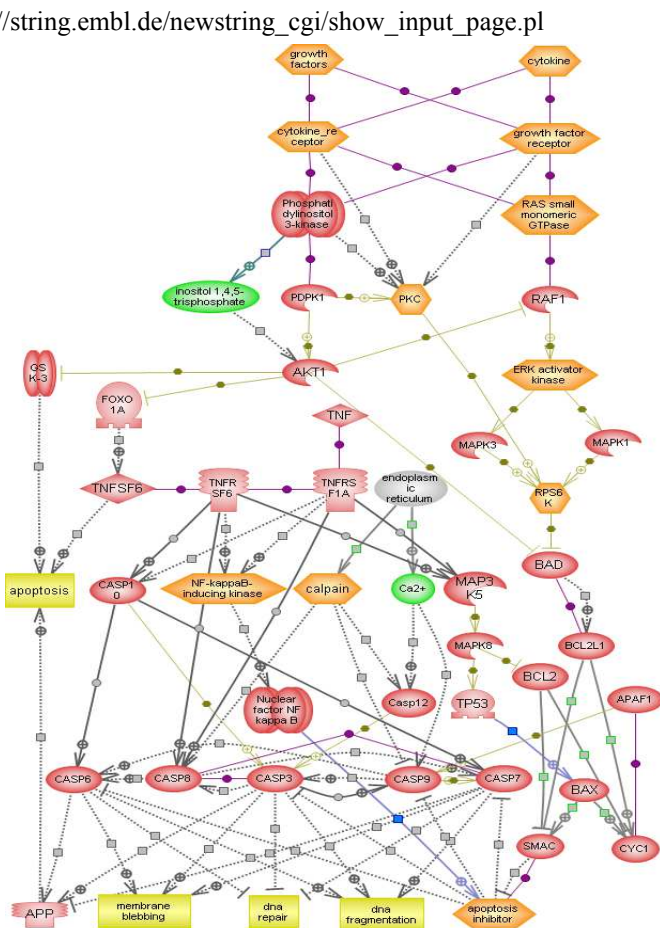
**Figure 31:** Utilisation de l'outil String pour générer un interactome entre les protéines d'intérêt et d'autres protéines appartenant à même processus biologique. Les protéines encadrées sont révélées par l'analyse protéomique (violet) et par l'analyse transcriptomique (vert).

[http://string.embl.de/newstring.cgi/show\\_input\\_page.pl](http://string.embl.de/newstring.cgi/show_input_page.pl)



**Figure 32:** Schéma de la voie Wnt canonique obtenue à l'aide de PANTHER.

[www.pantherdb.org/panther/](http://www.pantherdb.org/panther/)



**Figure 33:** Utilisation de l'outil PATHWAY STUDIO pour générer les différentes interactions entre les gènes d'intérêt appartenant à la voie PI3K/Akt et d'autres gènes appartenant au même processus biologique.

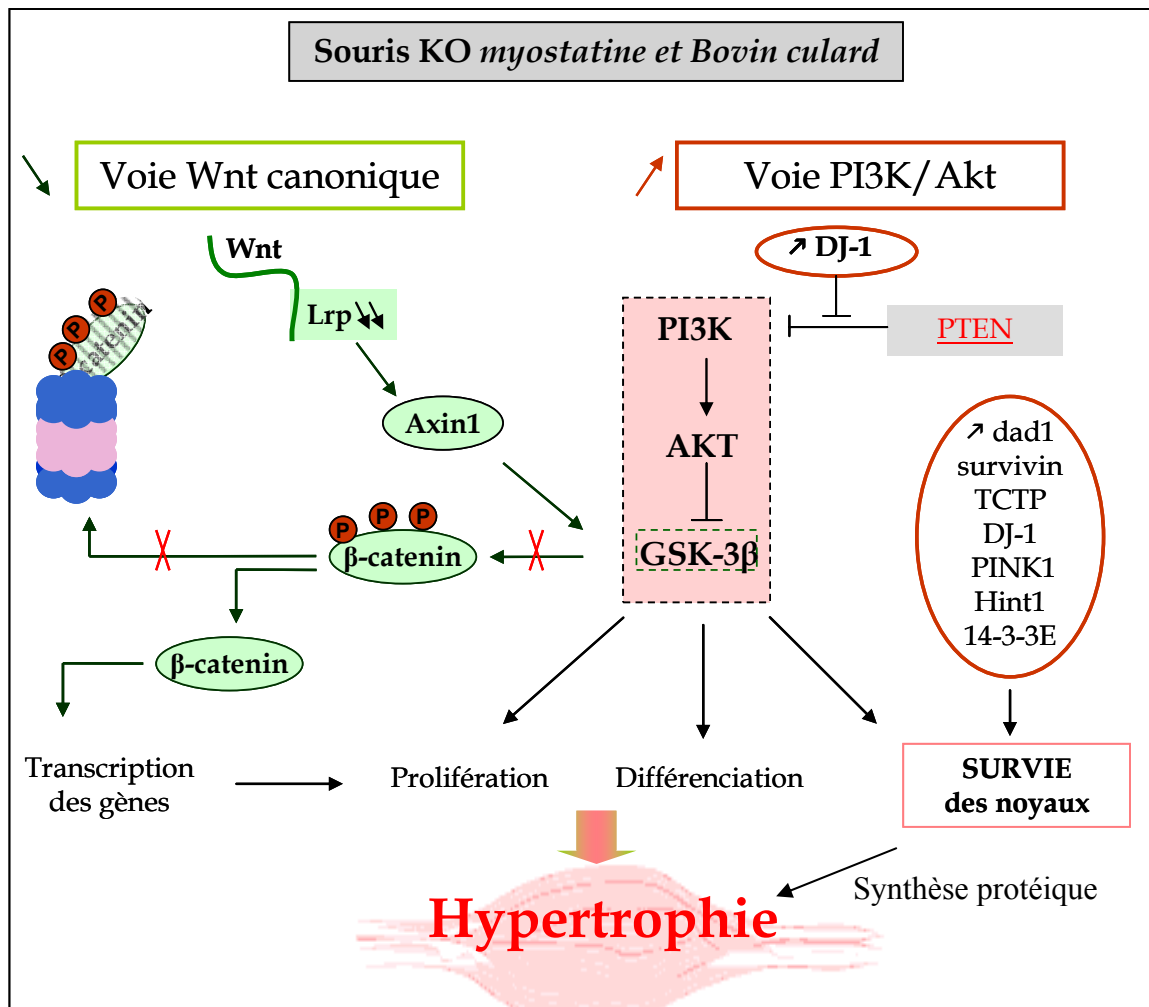
[www.ariadngenomics.com/products/pathway-studio/](http://www.ariadngenomics.com/products/pathway-studio/)

réalisé en appliquant la technique développée au laboratoire pour l'analyse d'extraits musculaires obtenus pour une préparation de muscle écrasé appelée "Crushed Muscle".

Néanmoins, sur la base de la liste de protéines différentielles, j'ai pu compléter les résultats de l'analyse protéomique par une démarche exploratoire des données à partir des bases de données internationales. Les outils bioinformatiques DAVID, PANTHER et STRING m'ont permis de classer les protéines et de leur attribuer une fonction. Ces outils ont été utilisés pour générer des interactomes entre les différentes protéines d'intérêt révélées par l'analyse protéomique et d'autres protéines impliquées dans le même processus biologique (figure 31). La constitution de ces interactomes à partir de mes données a permis de peaufiner la recherche de nouvelles cibles de la myostatine.

De façon complémentaire, l'analyse transcriptomique a contribué à établir et compléter la liste des cibles de la myostatine. Elle m'a permis de recueillir également de nouvelles informations concernant les mécanismes biologiques différentiellement mis en jeu entre les souris KO MSTN et leurs témoins. Cette analyse a reposé sur l'utilisation de puces à oligonucléotides ("Myochips" en collaboration avec la plateforme Genopôle Ouest de Nantes) comportant 6473 oligonucléotides représentatifs de gènes murins (24%) et humains (76%). La limite méthodologique de cette technique était liée au nombre et type de gènes représentés sur la puce, certains n'étant pas présents. La liste des gènes déclarés différentiels a été utilisée pour interroger les bases de données ontologiques et bibliographiques DAVID, PANTHER et Genomatix afin de rechercher les différents processus biologiques dans lesquels ces gènes d'intérêt étaient susceptibles d'intervenir, et par exemple de révéler des voies biologiques répertoriées dans KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (figures 32 et 33).

Comme attendu l'analyse protéomique et l'analyse transcriptomique, deux approches différentes mais complémentaires, m'ont permis d'établir une liste de cibles de MSTN, parmi lesquelles certaines se sont révélées être de nouvelles cibles de ce facteur. En utilisant en parallèle ces deux techniques innovantes, sans *a priori*, j'ai pu mettre en évidence des changements dans certains processus biologiques associés à l'inactivation de la MSTN. L'intégration de l'ensemble des données de transcriptomique et protéomique a révélé une expression différentielle d'un certain nombre de gènes et protéines liés au métabolisme énergétique des muscles, à la voie Wnt canonique (en accord avec Steelman et al., 2006), à la cascade PI3K/Akt et à la voie de survie cellulaire/apoptose. La modulation de ces deux dernières voies est un résultat original, car c'est la première fois qu'elle est mise en évidence en relation avec l'absence de myostatine.



**Figure 34:** Voies cibles de la myostatine impliquées dans l'hypertrophie musculaire révélées par l'utilisation des techniques de génomique fonctionnelle.

Les mécanismes en aval de l'activation de la voie PI3K ont été partiellement explorés au cours de la thèse. Les mécanismes liés à la voie Wnt canonique, en partie abordés dans le même modèle dans le laboratoire du Pr. Reecy (Steelman *et al.*, 2006), seront analysés dans le programme ANR "MYOTROPHY".

## II. Nouvelles voies biologiques cibles de la myostatine émanant des approches de génomique fonctionnelle

Comme vu ci-dessus, la première étude de mon travail a apporté de nombreuses données en accord avec celles rapportées dans la bibliographie mais également de nouvelles pistes concernant les cibles de la myostatine.

Tout d'abord, le phénotype moléculaire des souris KO MSTN a été caractérisé et a révélé une sur-abondance de protéines impliquées dans le métabolisme glycolytique, telles que la Glycogène phosphorylase et l'Enolase-1 et une sous-abondance des protéines marqueurs du métabolisme oxydatif telles que la H-FABP, la Succinate dehydrogenase et l'Isocitrate dehydrogenase. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues chez le Bovin culard (Bouley *et al.*, 2005, Cassar-Malek *et al.*, 2007). Ils ne sont pas surprenants car la perte de fonction de la myostatine chez la Souris et le Bovin a pour conséquence une orientation des fibres musculaires vers le type glycolytique rapide (Bouley *et al.*, 2005, Girgenrath *et al.*, 2005). De plus, en accord avec (Cassar-Malek *et al.*, 2007, Welle *et al.*, 2009b), l'analyse du transcriptome a révélé une diminution de l'expression de gènes codant pour des collagènes (COL18a1, 4a2, 6a1, cf Additional files de la publication 1) ce qui est cohérent avec la faible teneur en collagène des muscles des bovins culards.

Mes résultats montrent également une activation de la cascade PI3K/Akt en l'absence de la myostatine fonctionnelle. Or, cette cascade joue un rôle positif dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire (Figure 34). La mise en évidence d'une augmentation de l'abondance de la protéine DJ-1 a constitué la piste à l'origine de l'exploration de la voie PI3K. Cette protéine, en effet, est un activateur indirect de la cascade PI3K/Akt *via* l'inhibition d'un suppresseur de tumeur Pten (Kim *et al.*, 2005). Or l'activation de la voie PI3K, en particulier *via* Akt, induit l'activation des voies de synthèse protéique à l'origine d'une hypertrophie des fibres musculaires (Lai *et al.*, 2004). Ceci est en accord avec une étude récente qui montre que l'électrotransfert de MSTN induit une diminution de la voie Akt/mTOR et par conséquent une diminution de la synthèse protéique dans le muscle *Tibialis anterior* de Rat (Amirouche *et al.*, 2009). Comme décrit dans la partie 'Introduction bibliographique', l'activation de la voie PI3K/Akt aurait aussi comme cibles en aval l'activation de mTOR, et la phosphorylation des protéines de la famille Foxo. Ceci pourrait avoir comme conséquences une inhibition de l'activité transcriptionnelle des protéines FoxO, une augmentation de la synthèse protéique et une diminution de la protéolyse *via* la réduction

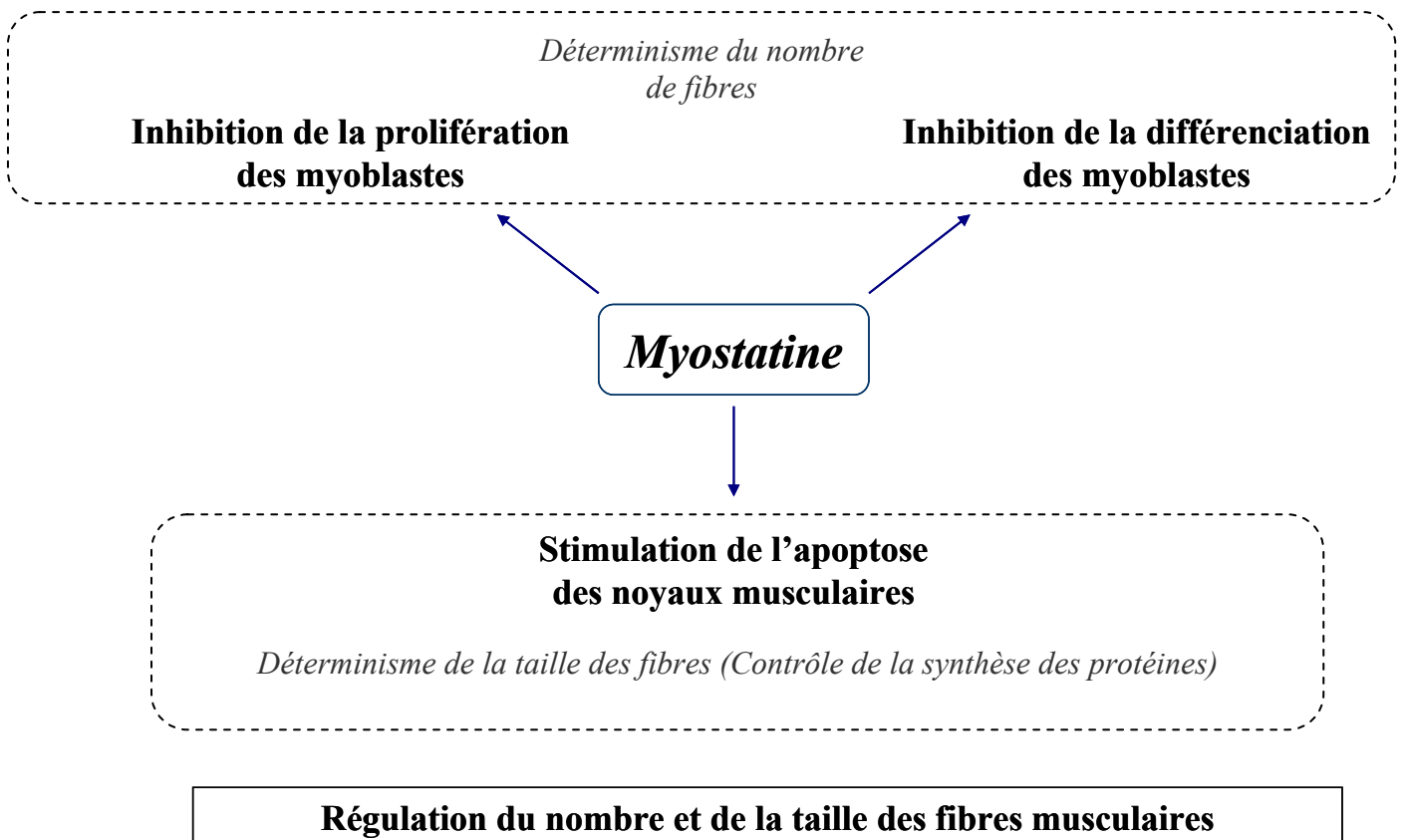




de l'expression des atrogènes comme MuRF1 et MAFbx (Sandri *et al.*, 2004, Stitt *et al.*, 2004). Toutefois, l'analyse des signatures moléculaires n'a révélée aucune modification dans l'expression et l'abondance des composants des voies mTOR et de FoxO. Ceci peut s'expliquer sans doute par la faible quantité de ces facteurs dans les muscles. Ces voies pourraient être explorées de façon plus spécifique à l'avenir.

D'autre part, mes résultats indiquent aussi une diminution de l'activité de la voie Wnt canonique, une voie connue pour son implication dans la prolifération cellulaire. Ces résultats sont en accord avec ceux de Steelman *et al.*, (2006) qui ont montré une diminution de la voie Wnt canonique et une augmentation de la voie Wnt calcique dans les muscles *Pectoralis* de souris KO MSTN en comparaison de leurs témoins. En particulier, le gène *Lrp* est sous-exprimé dans le *Quadriceps* de ces souris. Cette sous-expression pourrait avoir pour conséquence une augmentation de l'activité de la GSK-3 $\beta$ , une enzyme essentielle pour différentes voies de signalisation (figure 26). Or, une fois activée GSK-3 $\beta$  induit la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine (protéine clé de la voie Wnt canonique) et favorise ainsi sa dégradation par le protéasome (figure 34). Dans les muscles de souris KO MSTN, cette cascade pourrait être contre-balançée par l'activation de la voie PI3K/Akt, qui conduit à l'inactivation de la GSK-3 $\beta$ . De ce fait, la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, et donc sa dégradation seraient inhibées. La  $\beta$ -caténine serait alors transloquée au niveau nucléaire où elle activerait la transcription de ses gènes cibles impliqués dans la prolifération. Les mécanismes liés à la voie Wnt canonique n'ont pas été abordés au cours de ce travail, mais seront analysés dans le programme ANR "MYOTROPHY" en utilisant un PCR array dédié à cette voie. De même, l'abondance et la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, connue pour son rôle clé dans la voie Wnt canonique, seront analysées.

Enfin, mon travail de thèse a révélé, pour la première fois, une augmentation de l'expression et de l'abondance d'un certain nombre de gènes et de protéines impliqués dans la survie cellulaire, et dotés d'une action anti-apoptotique comme *Dad1*, *Survivine*, *TCTP*, *14-3-3 $\epsilon$*  et *PINK1*. Ces résultats m'ont conduit à faire l'hypothèse que l'inactivation de la MSTN s'accompagnait d'une augmentation de la survie des cellules musculaires et d'une diminution de l'apoptose des noyaux musculaires. Au cours de la publication 2, j'ai pu montrer que l'apoptose était atténuée dans les muscles des souris KO MSTN. Ce résultat liant la myostatine à l'apoptose est original, il relève l'ambiguïté sur l'influence de la myostatine en démontrant que ce facteur régule l'apoptose et la survie dans le muscle. En effet, les résultats rapportés dans la bibliographie étaient contradictoires (Thomas *et al.*, 2000, Ríos *et al.*, 2002, Joulia *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2005) et ne permettraient pas de conclure sur l'influence de



**Figure 35:** Dans le muscle, plusieurs mécanismes d'action de la myostatine sont impliqués dans la régulation de la masse musculaire.

L'inhibition de la prolifération et de la différenciation au cours de la myogenèse est impliquée dans le déterminisme du nombre de fibres. L'action stimulatrice de l'apoptose des noyaux serait impliquée, conjointement avec la synthèse des protéines, dans la régulation de la taille des fibres, notamment au cours de la vie post-natale.

myostatine sur l'apoptose. La divergence de des conclusions de ces études pourrait être liée aux conditions utilisées *in vitro* dans ces études ou au stade physiologique des cellules musculaires étudiées (en prolifération ou en différenciation). La contribution de l'apoptose à la régulation de la masse musculaire (atrophie) a été largement décrite dans la littérature, dans plusieurs maladies musculaires et au cours de vieillissement. L'activation des signaux moléculaires impliqués dans l'apoptose et la réduction de la taille du domaine nucléocytoplasmique ont été décrites dans plusieurs modèles d'atrophie. Par exemple, Always et al. (2003) ont rapporté que l'expression de l'Id2 est augmentée conjointement à l'activation des caspases lors de la perte de la masse musculaire chez les oiseaux. De plus, l'expression de Bax, protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl-2, est augmentée lors de l'atrophie musculaire associée à la dénervation (Siu and Allway, 2005). En accord avec l'étude de Reisz-Porszasz *et al.* (2003) indiquant que la myostatine serait impliquée dans l'atrophie musculaire caractérisée par une diminution de la taille des fibres et du nombre total des myonuclei, mes résultats montrent que l'inactivation de la MSTN est associée à une survie des noyaux musculaires, à une sur-abondance des facteurs anti-apoptotiques ainsi qu'une sous-expression des facteurs pro-apoptotiques (publication 2). Néanmoins la méthode de TUNEL ne permet de révéler des noyaux apoptotiques de diverses origines (fibres, cellules conjonctives...). Il serait donc intéressant d'utiliser d'autres marquages spécifiques afin de vérifier l'origine des noyaux apoptotiques (myoblastes, cellules satellites, fibroblastes ou encore adipocytes) et leurs pourcentages respectifs. L'ensemble de mes résultats est en faveur d'une résistance des noyaux musculaires à l'apoptose, chez la Souris (publication 2) et le Bovin (publication 3). Cette résistance pourrait contribuer, en partie, au développement de l'hypertrophie musculaire par une augmentation de la synthèse protéique. Ainsi, en plus de son action inhibitrice de la prolifération et de la différenciation, la myostatine pourrait influencer l'apoptose et ainsi réguler la masse musculaire par ce mécanisme. En effet, dans cette étude, l'inactivation de la MSTN s'est avérée suffisante pour induire une diminution de l'apoptose dans le muscle squelettique. Ceci est en faveur d'une résistance des noyaux des fibres musculaires à l'apoptose qui aurait comme conséquence une augmentation de la synthèse protéique et donc contribuerait à l'hypertrophie musculaire (figure 35).

Il est indiqué dans la revue de Ouali *et al.* (2006) que l'administration des inhibiteurs de caspases a pour conséquence la production d'une viande dure. Ceci suggère que le phénomène de l'apoptose serait impliqué dans la maturation de la viande et donc dans le déterminisme de sa tendreté. Toutefois, les bovins culards présentent une résistance à l'apoptose et produisent une viande tendre. Clinquart *et al.* (1998) ont rapporté que les bovins



culards Blanc Bleu Belge présentent un problème de maturation de leur viande essentiellement lié à la diminution de l'activité enzymatique des enzymes protéolytiques, en particulier de celle de la calpaïne, impliquées dans le processus de maturation. Ceci suggère donc que la tendreté qui caractérise la viande des bovins culards serait davantage liée à sa faible teneur en collagène (Bailey *et al.*, 1982).

### III. Pertinence biologique des cibles de la myostatine

Une démarche originale de ce travail de thèse est d'avoir utilisé deux modèles d'hypertrophie musculaire, la Souris KO MSTN et le Bovin culard, pour répondre à la problématique de la thèse. Le modèle murin m'a permis l'identification de nouvelles cibles moléculaires de la myostatine susceptibles d'être impliquées dans l'hypertrophie. Les processus biologiques dégagés à partir de ce modèle ont été ensuite confirmés dans le modèle Bovin. La convergence des données chez la Souris et le Bovin indique la pertinence de ces processus biologiques, notamment la résistance à l'apoptose, dans la régulation de la masse musculaire, quels que soient l'espèce étudiée, l'âge et le stade de développement (foetal ou post-natal des animaux). Par exemple, mes résultats suggèrent que Traf2 pourrait être un nouveau marqueur important de la croissance musculaire chez la Souris et le Bovin. Ce membre de la famille Traf est impliqué dans l'activation de la voie NFκB (Rothe *et al.*, 1995). Il jouerait un rôle essentiel dans la différenciation et dans la croissance musculaire (Timothy and Antonio, 1998) puisque son inactivation a pour conséquence de perturber la myogenèse. Il sera intéressant à l'avenir de vérifier la contribution de la voie NFκB à l'hypertrophie musculaire, par exemple en utilisant des PCR array dédiés qui sont disponibles dans le commerce.

Mon travail de thèse a montré que l'expression et l'abondance des gènes et des protéines sont altérées en réponse à l'inactivation de la MSTN. Toutefois la question est posée de savoir si ce sont bien des cibles en aval de la myostatine ou si l'altération de leur expression est une conséquence de l'hypertrophie musculaire induite par l'inactivation de la MSTN.

Pour répondre en partie à cette question, il avait initialement été envisager d'utiliser un modèle KO conditionnel MSTN (Grobet *et al.*, 2003) et de tester les conséquences de l'inactivation de la MSTN en période postnatale. Toutefois, ce modèle n'étant plus disponible, j'ai développé un modèle de surexpression *in vivo* chez la Souris dans le programme ANR



"MYOTROPHY" (Cf chapitre des résultats et discussion). Ce modèle permettra tout d'abord de vérifier si les voies PI3K/Akt, Wnt canonique et la voie de l'apoptose sont altérées.

*En conclusion, ce travail de thèse a enrichi les connaissances sur les mécanismes d'action de la MSTN en révélant des voies biologiques modulées en réponse à l'inactivation de ce facteur. En particulier, il a révélé de nouvelles cibles potentielles de la myostatine impliquées dans l'hypertrophie (voies PI3K, Survie/Apoptose) et des nouveaux marqueurs d'hypertrophie (DJ-1, Traf-2 en particulier). Ces résultats, associés aux données bibliographiques, apportent des informations applicables en agronomie pour gérer la masse musculaire et ses propriétés dans un objectif d'efficacité de production et de qualité de viande. Ils sont susceptibles aussi d'apporter des informations utiles pour le milieu médical afin de comprendre comment contrôler la masse musculaire dans le cadre de pathologies.*





*Références  
bibliographiques*



1. Allen DL and Unterman TG 2007. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C188-199.
2. Allen DL, Roland R, Roy V and Reggie E 1999. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle & Nerve* 22, 1350-1360.
3. Allen DL, Monke SR, Talmadge RJ, Roy RR and Edgerton VR 1995. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J Appl Physiol* 78, 1969-1976.
4. Alway SE, Martyn JK, Ouyang J, Chaudhrai A and Murlasits ZS 2003. Id2 expression during apoptosis and satellite cell activation in unloaded and loaded quail skeletal muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R540-549.
5. Alzghoul MB, Gerrard D, Watkins BA and Hannon K 2004. Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo. *FASEB Journal* 18, 221-223.
6. Amirouche A, Durieux A-C, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A and Freyssenet D 2009. Down-Regulation of Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway in Response to Myostatin Overexpression in Skeletal Muscle. *Endocrinology* 150, 286-294.
7. Amthor H, McKinnell I and Patel K 2003. Stop and go - myostatin reversibly inhibits proliferation and differentiation of muscle precursors. *Neuromuscular Disorders* 13, 636-636.
8. Amthor H, Christ B, Weil M and Patel K 1998. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Current Biology* 8, 642-652.
9. Armand A-S, Lécolle S, Launay T, Pariset C, Fiore F, Della Gaspera B, Birnbaum D, Chanoine C and Charbonnier F 2004. IGF-II is up-regulated and myofibres are hypertrophied in regenerating soleus of mice lacking FGF6. *Experimental Cell Research* 297, 27-38.
10. Artaza JN, Bhasin S, Mallidis C, Taylor W, Ma K and Gonzalez-Cadavid NF 2002. Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology* 190, 170-179.
11. Artaza JN, Bhasin S, Magee TR, Reisz-Porszasz S, Shen R, Groome NP, Fareez MM and Gonzalez-Cadavid NF 2005. Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells. *Endocrinology* 146, 3547 - 3557.
12. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A and Rudnicki MA 2002. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 159, 123-134.
13. Ashmore C, Parker W, Stokes H and Doerr L 1974. Comparative aspects of muscle fibre types in fetuses of the normal and double muscled cattle. *Growth* 38, 501 - 506.
14. Bailey AJ, Enser MB, Dransfield E, Restall DJ and Avery NC 1982. Muscle and adipose tissue from normal and double muscled cattle: collagen types, muscle fiber diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties. Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production, 178 - 204.
15. Bajard L, Relaix F, Lagha M, Rocancourt D, Daubas P and Buckingham ME 2006. A novel genetic hierarchy functions during hypaxial myogenesis: Pax3 directly activates Myf5 in muscle progenitor cells in the limb. *Genes & Development* 20, 2450-2464.



16. Bellinge RHS, Liberles DA, Iaschi SP, O'Brien AA and Tay GK 2005. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal Genetics* 36, 1-6.
17. Bendall AJ, Rincon-Limas DE, Botas J and Abate-Shen C 1998. Protein complex formation between Msx1 and Lhx2 homeoproteins is incompatible with DNA binding activity. *Differentiation* 63, 151-157.
18. Bennett AM and Tonks NK 1997. Regulation of Distinct Stages of Skeletal Muscle Differentiation by Mitogen-Activated Protein Kinases. *SCIENCE* 278, 1288-1291.
19. Bernard C, Cassar-Malek I, Renand G and Hocquette JF 2009. Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in young bulls. *Meat Science* 82, 205-212.
20. Biressi S, Molinaro M and Cossu G 2007. Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development. *Developmental Biology* 308, 281-293.
21. Black BL and Olson EN 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 167.
22. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A and Birchmeier C 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-771.
23. Bober E, Lyons GE, Braun T, Cossu G, Buckingham M and Arnold HH 1991. The Muscle Regulatory Gene, Myf-6, Has a Biphasic Pattern of Expression During Early Mouse Development. *Journal of Cell Biology* 113, 1255-1265.
24. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD and Glass DJ 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *SCIENCE* 294, 1704 - 1708.
25. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TOB, Whittmore L-A and Khurana TS 2005. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB J.* 19, 543-549.
26. Borycki AG, Brunk B, Tajbakhsh S, Buckingham M, Chiang C and Emerson CP 1999. Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. *Development* 126, 4053-4063.
27. Bouley J, Chambon C and Picard B 2004. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 1811-1824.
28. Bouley J, Meunier B, Chambon C, De Smet S, Hocquette JF and Picard B 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics* 5, 490-500.
29. Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH and Jaenisch R 1992. Targeted Inactivation of the Muscle Regulatory Gene Myf-5 Results in Abnormal Rib Development and Perinatal Death. *Cell* 71, 369-382.
30. Bryson-Richardson RJ and Currie PD 2008. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet* 9, 632-646.
31. Buckingham M 1992. Making muscle in mammals. *Trends in Genetics* 8, 144-149.
32. Buckingham M 2001. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 440-448.



33. Buckingham M and Relaix F 2007. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23, 645-673.
34. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt D and Relaix F 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of Anatomy* 202, 59-68.
35. Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, López-Soriano FJ, Fearon KCH and Argilés JM 2007. Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clinical Nutrition* 26, 614-618.
36. Cai D, Frantz JD, Tawa Jr NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HGW, Hasselgren P-O, Frontera WR, Lee J, Glass DJ and Shoelson SE 2004. IKK[ $\beta$ ]/NF- $\kappa$ B Activation Causes Severe Muscle Wasting in Mice. *Cell* 119, 285-298.
37. Carlson CJ, Booth FW and Gordon SE 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277, R601-606.
38. Cassar-Malek I, Passelaigue F, Bernard C, Leger J and Hocquette J-F 2007. Target genes of myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses. *BMC Genomics* 8, 63.
39. Cassens RG, Cooper CC and C.O. Chichester EMMaGFS 1971. Red and White Muscle. In *Advances in Food Research*, pp. 1-74, Academic Press.
40. Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H and Baltimore D 1998. Activation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1 (ASK1) by the Adapter Protein Daxx. *SCIENCE* 281, 1860-1863.
41. Charge SBP and Rudnicki MA 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews* 84, 209-238.
42. Charlier C, Coppeters W, Farnir F, Grobet L, Leroy PL, Michaux C, Mni M, Schwers A, Vanmanshoven P, Hanset R and al e 1995. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mamm Genome* 6, 788-792.
43. Childs 2003. Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy. *Cell Physiology* 285, C391-C398.
44. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M and Dixit VM 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
45. Clinquart A, Hornick JL, Van Eenaeme C and Istasse L 1998. The influence of double muscling on production and quality of meat in Belgian Blue cattle. *Productions Animales* 11, 285-297.
46. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C and Georges M 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *nature genetics* 38, 813-818.
47. Cohen GM 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16.
48. Coleman 1995. Myogenic Vector Expression of Insulinlike Growth Factor I Stimulates Muscle Cell Differentiation and Myofiber Hypertrophy in Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 270, 12109-12116.





49. Cserjesi P and Olson EN 1991. Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4854-4862.
50. Culley G 1807. *Observations on livestock*. 4th ed. London, G. Woodfall.
51. De Castro Rodrigues A, Andreo JC and De Mattos Rodrigues SP 2006. Myonuclei and satellite cells in denervated rat muscles: An electron microscopy study. *Microsurgery* 26, 396-398.
52. Delapeyriere O, Ollendorff V, Planche J, Ott MO, Pizette S, Coulier F and Birnbuam D 1993. Expression of the Fgf6 Gene Is Restricted to Developing Skeletal-Muscle in the Mouse Embryo. *Development* 118, 601-611.
53. Deveaux V, Picard B, Bouley J and Cassar-Malek I 2003. Location of myostatin expression during bovine myogenesis in vivo and in vitro. *Reprod Nutr Dev* 43, 527 - 542.
54. Diehl JA, Cheng MG, Roussel MF and Sherr CJ 1998. Glycogen synthase kinase 3 beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development* 12, 3499-3511.
55. Draeger A, Weeds AG and Fitzsimons RB 1987 Primary, secondary and tertiary myotubes in developing skeletal muscle: a new approach to the analysis of human myogenesis. *J. Neurol. Sci.* 81, 19-43.
56. Dupont-Versteegden 2002. Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin-NFAT pathway. *Cell Physiology* 282, C1387-C1395
57. Dupont-Versteegden EE 2005. Apoptosis in muscle atrophy: Relevance to sarcopenia. *Experimental Gerontology* 40, 473-481.
58. Dupont-Versteegden EE 2006. Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World J Gastroenterol* ; 12, 7463-7466.
59. Durieux A-C, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Padeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A and Freyssenet D 2007. Ectopic Expression of Myostatin Induces Atrophy of Adult Skeletal Muscle by Decreasing Muscle Gene Expression. *Endocrinology* 148, 3140-3147.
60. Duris MP, Renand G and Picard B 1999. Genetic Variability of Foetal Bovine Myoblasts in Primary Culture. *The Histochemical Journal* 31, 753-760.
61. Edmondson DG, Cheng TC, Cserjesi P, Chakraborty T and Olson EN 1992. Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3665-3677.
62. Evans D, Baillie H, Caswell A and Wigmore P 1994. During Fetal Muscle Development, Clones of Cells Contribute to Both Primary and Secondary Fibers. *Developmental Biology* 162, 348-353.
63. Ferreira R, Neuparth MJ, Vitorino R, Appell HJ, Amado F and Duarte JA 2008. Evidences of apoptosis during the early phases of soleus muscle atrophy in hindlimb suspended mice. *Physiological Research* 57, 601-611.
64. Ferrell RE, Conte V, Lawrence EC, Roth SM, Hagberg JM and Hurley BF 1999. Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. *Genomics* 62, 203-207.



65. Fujio Y, Guo K, Mano T, Mitsuuchi Y, Testa JR and Walsh K 1999. Cell Cycle Withdrawal Promotes Myogenic Induction of Akt, a Positive Modulator of Myocyte Survival. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5073-5082.
66. Furukawa-Hibi 2002. FOXO Forkhead Transcription Factors Induce G2-M Checkpoint in Response to Oxidative Stress\*. *The journal of biological chemistry* 277, 26729-26732.
67. Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K and Motoyama N 2002. FOXO Forkhead Transcription Factors Induce G2-M Checkpoint in Response to Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 277, 26729-26732.
68. Gagnière H, Picard B and Geay Y 1999a. Contractile differentiation of foetal cattle muscles: intermuscular variability. *Reprod Nutr Dev* 39, 637 - 655.
69. Gagnière H, Picard B, Jurie C and Geay Y 1999b. Comparison of foetal metabolic differentiation in three cattle muscles. *Reproduction, nutrition, development* 39, 105-112.
70. Gagnière H, Ménissier F, Geay Y and Picard B 2000. Influence of genotype on contractile protein differentiation in different bovine muscles during foetal life. *Ann. Zootech.* 49, 405-423.
71. Garikipati DK, Gahr SA, Roalson EH and Rodgers BD 2007. Characterization of Rainbow Trout Myostatin-2 Genes (rtMSTN-2a and -2b): Genomic Organization, Differential Expression, and Pseudogenization. *Endocrinology* 148, 2106-2115.
72. Garry DJ, Yang Q, Bassel-Duby R and Williams RS 1997. Persistent Expression of MNF Identifies Myogenic Stem Cells in Postnatal Muscles. *Developmental Biology* 188, 280-294.
73. Garry DJ, Meeson A, Elterman J, Zhao Y, Yang P, Bassel-Duby R and Williams RS 2000. Myogenic stem cell function is impaired in mice lacking the forkhead/winged helix protein MNF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5416-5421.
74. Georges M, Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Pirottin D and Brouwers B 1998. Positional candidate cloning of the bovine mh locus identifies an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, Australia, January 11-16, 1998. Volume 26: Quantitative genetic theory; selection theory and experiments; internationalisation of breeding programs; detection of quantitative trait loci; exploitation of quantitative trait loci; quantitative trait loci maps; transgenics; developmental genetics.*, 195-202.
75. Girgenrath S, Song K and Whitemore LA 2005. Loss of myostatin expression alters fiber-type distribution and expression of myosin heavy chain isoforms in slow- and fast-type skeletal muscle. *Muscle & Nerve* 31, 34-40.
76. Goll DE, Klesse WC and Szpacenko A 1989. Skeletal muscle proteases and protein turnover. In *Animal growth regulation*, Pp 141-182. Edited by D. R. Hausman & R. J. Martin. New York: Plenum Publishing Corporation.
77. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A and Goldberg AL 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14440 - 14445.
78. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S and Bhasin S 1998a. Organization of the human myostatin



- gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. Proceedings of the National Academy of Sciences 95, 14938-14943.
79. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen RQ, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S and Bhasin S 1998b. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 14938-14943.
  80. Gorza L 1990. Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 257-265.
  81. Got F 1997. Accélération des processus de maturation de la viande bovine par traitements technologiques: injection de calcium; applications d'ultrasons de puissance. PhD Thesis. Université Blaise Pascal. Clermont-Ferrand, France.
  82. Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Menissier F, Zanotti M, Dunner S and Georges M 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian Genome* 9, 210-213.
  83. Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R and Georges M 2003. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *genesis* 35, 227-238.
  84. Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R and Georges M 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 17, 71 - 74.
  85. Guttridge 2004. Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 7, 443-450.
  86. Hamrick MW, Shi X, Zhang W, Pennington C, Thakore H, Haque M, Kang B, Isales CM, Fulzele S and Wenger KH 2007. Loss of myostatin (GDF8) function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading. *Bone* 40, 1544-1553.
  87. Han VK, D'Ercole AJ and Lund PK 1987. Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *SCIENCE* 236, 193-197.
  88. Hanset R and Michaux C 1985. On the Genetic Determinism of Muscular Hypertrophy in the Belgian White and Blue Cattle Breed .1. Experimental-Data. *Genetics Selection Evolution* 17, 359-368.
  89. Hanset R, Michaux C, Dessy-Doize C and Burtonboy G 1982. Studies on the 7th rib in double muscled and conventional cattle. In *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, vol. 16: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. Ed. King and Ménissier, Martinus Nijhoff, 341-349
  90. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN and Klein WH 1993. Muscle Deficiency and Neonatal Death in Mice with a Targeted Mutation in the Myogenin Gene. *Nature* 364, 501-506.
  91. Hawke TJ and Garry DJ 2001. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology* 91, 534-551.



92. Hay N and Sonenberg N 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 18, 1926-1945.
93. He J, Tegen SB, Krawitz AR, Martin GS and Luo K 2003. The Transforming Activity of Ski and SnoN Is Dependent on Their Ability to Repress the Activity of Smad Proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 30540-30547.
94. Hilder 2003. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 serine 307 correlates with JNK activity in atrophic skeletal muscle. *Federation of European Biochemical Societies* 553, 63-67.
95. Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM and Wolfman NM 2003. Regulation of myostatin in vivo by GASP-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol*, me.2002-0366.
96. Hinterberger TJ, Sassoon DA, Rhodes SJ and Konieczny SF 1991. Expression of the Muscle Regulatory Factor-Mrf4 During Somite and Skeletal Myofiber Development. *Developmental Biology* 147, 144-156.
97. Hocquette JF, Ortigues-Marty I, Pethick D, Herpin P and Fernandez X 1998. Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science* 56, 115-143.
98. Huang Z, Chen D, Zhang K, Yu B, Chen X and Meng J 2007. Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. *Cellular Signalling* 19, 2286-2295.
99. Huet C, Li ZF, Liu HZ, Black RA, Galliano MF and Engvall E 2001. Skeletal muscle cell hypertrophy induced by inhibitors of metalloproteases; myostatin as a potential mediator. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 281, C1624-C1634.
100. Hunter RB and Kandarian SC 2004. Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *Journal of Clinical Investigation* 114, 1504-1511.
101. Izumiya Y, Hopkins T, Morris C, Sato K, Zeng L, Viereck J, Hamilton JA, Ouchi N, LeBrasseur NK and Walsh K 2008. Fast/Glycolytic Muscle Fiber Growth Reduces Fat Mass and Improves Metabolic Parameters in Obese Mice. *Cell Metabolism* 7, 159-172.
102. Jeanplong F, Sharma M, Somers WG, Bass JJ and Kambadur R 2001. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Molecular and Cellular Biochemistry* 220, 31-37.
103. Ji M, Zhang Q, Ye J, Wang X, Yang W and Zhu D 2008. Myostatin induces p300 degradation to silence cyclin D1 expression through the PI3K/PTEN/Akt pathway. *Cellular Signalling* 20, 1452-1458.
104. Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FFS and Spurlock ME 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 275, R1265-1273.
105. Jope RS and Bijur GN 2002. Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3 and cell survival. *Mol Psychiatry* 7, S35-S45.
106. Joulia-Ekaza D and Cabello G 2006. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research* 312, 2401-2414.
107. Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B and Cabello G 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research* 286, 263-275.





108. Kambadur R, Sharma M, Smith TPL and Bass JJ 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Res.* 7, 910-915.
109. Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I and Ezaki O 2004. Skeletal Muscle FOXO1 (FKHR) Transgenic Mice Have Less Skeletal Muscle Mass, Down-regulated Type I (Slow Twitch/Red Muscle) Fiber Genes, and Impaired Glycemic Control. *J. Biol. Chem.* 279, 41114-41123.
110. Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V and Tajbakhsh S 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5 : Myod double-mutant mice. *Nature* 431, 466-471.
111. Kenny-Mobbs T and Thorogood P 1987. Autonomy of differentiation in avian branchial somites and the influence of adjacent tissues. *Development* 100, 449-462.
112. Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257.
113. Kerr T, Roalson EH and Rodgers BD 2005. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub-family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evolution & Development* 7, 390-400.
114. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu F-F, Tsao M-S and Mak TW 2005. DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 7, 263-273.
115. King JWB and Menissier F 1982. Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. 16, 387-428.
116. Kocamis H and Killefer J 2002. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 447-454.
117. Kocamis H, Richter J, Klandorf H and Killefer J 1999. The ontogeny of myostatin and follistatin mRNA expression during chicken embryonic development. *FASEB Journal* 13, A356-A356.
118. Kopan R, Nye JS and Weintraub H 1994. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. *Development* 120, 2385-2396.
119. Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD and Glass DJ 2004. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol* 24, 9295 - 9304.
120. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S and Kambadur R 2002. Myostatin Inhibits Myoblast Differentiation by Down-regulating MyoD Expression. *J. Biol. Chem.* 277, 49831-49840.
121. Langley B, Thomas M, McFarlane C, Gilmour S, Sharma M and Kambadur R 2004. Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway. *Oncogene* 23, 524-534.
122. Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D and Weintraub H 1991. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66, 305-315.



123. Lee S-J 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 61-86.
124. Lee S-J 2008. Genetic Analysis of the Role of Proteolysis in the Activation of Latent Myostatin. *PLoS ONE* 3, e1628.
125. Lee S-J and McPherron AC 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 9306-9311.
126. Lee SJ and McPherron AC 1999. Myostatin and the control of skeletal muscle mass. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 604-607.
127. Lefaucheur L, Edom F, Ecolan P and Butler-Browne GS 1995. Pattern of muscle fiber type formation in the pig. *Developmental Dynamics* 203, 27-41.
128. Leger B, Derave W, De Bock K, Hespel P and Russell AP 2008. Human Sarcopenia Reveals an Increase in SOCS-3 and Myostatin and a Reduced Efficiency of Akt Phosphorylation. *Rejuvenation Research* 11, 163-175B.
129. Li H, Zhu H, Xu C-j and Yuan J 1998. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
130. Li YP, Atkins CM, Sweatt JD and Reid MB 1999. Mitochondria mediate tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB signaling in skeletal muscle myotubes. *Antioxid Redox Signal* 1, 97-104.
131. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL and Reid MB 2005. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb J* 19, 362 - 370.
132. Lin J, Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL and Baile CA 2002. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 291, 701 - 716.
133. Link M, Aydogdu T, Guo S, Koniaris LG and Zimmers TA 2008. QS99. Genetic and Pharmacologic Inhibition of Myostatin for Muscle Preservation in Cancer Cachexia. *Journal of Surgical Research* 144, 307-307.
134. Listrat A, Picard B, Jailler R, Collignon H, Peccatte JR, Micol D, Geay Y and Dozias D 2001. Grass valorisation and muscular characteristics of blonde d'Aquitaine steers. *Animal Research* 50, 105-118.
135. Liu W, Thomas SG, Asa SL, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S and Ezzat S 2003. Myostatin Is a Skeletal Muscle Target of Growth Hormone Anabolic Action. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 5490-5496.
136. Luo K, Stroschein SL, Wang W, Chen D, Martens E, Zhou S and Zhou Q 1999. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev.* 13, 2196-2206.
137. Luo KX 2004. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, 65-70.
138. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J and Salehian B 2003. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E363-371.



139. Manceau M, Gros Jrm, Savage K, ThomÃ© V, McPherron A, Paterson B and Marcelle C 2008. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. *Genes & Development* 22, 668-681.
140. Mascarello F, Stecchini ML, Rowleron A and Balocchi E 1992. Tertiary Myotubes in Postnatal Growing Pig Muscle Detected by Their Myosin Isoform Composition. *Journal of Animal Science* 70, 1806-1813.
141. Massague J 1990. Control of Cell Growth and Differentiation by Tgf-Beta. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 33.
142. McArdle A, Maglara A, Appleton P, Watson AJM, Grierson I and Jackson MJ 1999. Apoptosis in multinucleated skeletal muscle myotubes. *Laboratory Investigation* 79, 1069-1076.
143. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M and Kambadur R 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J. Cell Biol.* 162, 1135-1147.
144. McFarland 2007. The role of myostatin in chicken (*Gallus domesticus*) myogenic satellite cell proliferation and differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 151, 351 - 357.
145. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M and Kambadur R 2006. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 209, 501 - 514.
146. McMahan CD, Popovic L, Oldham JM, Jeanplong F, Smith HK, Kambadur R, Sharma M, Maxwell L and Bass JJ 2003. Myostatin-deficient mice lose more skeletal muscle mass than wild-type controls during hindlimb suspension. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E82 - 87.
147. McPherron AC and Lee S-J 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 12457-12461.
148. McPherron AC and Lee S-J 2002. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 109, 595-601.
149. McPherron AC, Lawler AM and Lee S-J 1997a. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83-90.
150. McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ 1997b. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83 - 90.
151. Mendler L, Zador E, Ver Heyen M, Dux L and Wuytack F 2000. Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 21, 551-563.
152. Menissier F 1982. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. *Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production*, 21 - 53.
153. Mennerich D, Schäfer K and Braun T 1998. Pax-3 is necessary but not sufficient for Ibx1 expression in myogenic precursor cells of the limb. *Mechanisms of Development* 73, 147-158.
154. Meunier B, Bouley J, Piec I, Bernard C, Picard B and Hocquette J-F 2005. Data analysis methods for detection of differential protein expression in two-dimensional gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 340, 226-230.



155. Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J-i, Hattori A, Hennebry A, Berry CJ, Sharma M, Kambadur R and Nishimura T 2006. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340, 675-680.
156. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG and Ostrander EA 2007. A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs. *PLoS Genetics* 3, 79.
157. Moss FP and Leblond CP 1971. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *The Anatomical Record* 170, 421-435.
158. Muroya S, Nakajima I and Chikuni K 2002. Related Expression of MyoD and Myf5 with Myosin Heavy Chain Isoform Types in Bovine Adult Skeletal Muscles. *Zoological Science* 19, 755-761.
159. Musaro 1999. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400, 581-585.
160. Musarò 2001. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *nature genetics* 27, 195-200.
161. Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li SW, Nonaka I and Nabeshima Y 1993. Myogenin Gene Disruption Results in Perinatal Lethality Because of Severe Muscle Defect. *Nature* 364, 532-535.
162. Naidu PS, Ludolph DC, To RQ, Hinterberger TJ and Konieczny SF 1995. Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2707-2718.
163. Naya FJ and Olson E 1999. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 683-688.
164. Naya FJ, Mercer B, Shelton J, Richardson JA, Williams RS and Olson EN 2000. Stimulation of Slow Skeletal Muscle Fiber Gene Expression by Calcineurin in Vivo. *J. Biol. Chem.* 275, 4545-4548.
165. Nicholas G, Thomas M, Langley B, Somers W, Patel K, Kemp CF, Sharma M and Kambadur R 2002. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *Journal of Cellular Physiology* 193, 120-131.
166. Nishiyama A, Takeshima Y, Saiki K, Narukage A, Oyazato Y, Yagi M and Matsuo M 2007. Two novel missense mutations in the myostatin gene identified in Japanese patients with Duchenne muscular dystrophy. *BMC Medical Genetics* 8, 19.
167. Ohanna M, Sobering AK, Lapointe T, Lorenzo L, Praud C, Petroulakis E, Sonenberg N, Kelly PA, Sotiropoulos A and Pende M 2005. Atrophy of S6K1<sup>-/-</sup> skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol* 7, 286-294.
168. Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S and Sunada Y 2006. Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *J Clin Invest* 116, 2924 - 2934.
169. Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, Yasue A, Moriyama K, Murakami T, Tsuchida K, Noji S and Sunada Y. 2006 Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *J Clin Invest* 116, 2924-2934.





résultats de Listrat *et al.* (2005). Ce résultat montre qu'IGF2 est un marqueur de la croissance musculaire chez les fœtus culards et normaux.

*Ainsi, ce troisième volet de ma thèse a permis de confirmer que la perte de fonction de la myostatine chez les bovins culards conduit à une augmentation de la survie des cellules via l'activation de la cascade PI3K/Akt, à une orientation glycolytique des muscles et à une augmentation de l'expression et de l'abondance des facteurs de survie cellulaire, comme c'est le cas chez les souris KO MSTN. Cette étude a confirmé également une modification dans l'expression des facteurs apoptotiques en faveur d'une résistance à l'apoptose. Ces résultats soulignent donc la pertinence biologique de l'hypothèse avancée lors des deux premières études. En effet, les mêmes mécanismes semblent participer au développement d'un phénotype hypermusclé chez des animaux d'espèces, d'âge et de sexe différents, présentant une inactivation de la myostatine.*



170. Oldham JM, Martyn JAK, Sharma M, Jeanplong F, Kambadur R and Bass JJ 2001. Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 280, R1488-R1493.
171. Oldham JM, Osepchook CC, Jeanplong F, Falconer SJ, Matthews KG, Conaglen JV, Gerrard DF, Smith HK, Wilkins RJ, Bass JJ and McMahon CD 2009. The decrease in mature myostatin protein in male skeletal muscle is developmentally regulated by growth hormone. *The Journal of Physiology* 587, 669-677.
172. Olguin HC and Olwin BB 2004. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Developmental Biology* 275, 375-388.
173. Ouali A, Herrera-Mendez CH, Coulis G, Becila S, Boudjellal A, Aubry L and Sentandreu MA 2006. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. *Meat Science* 74, 44-58.
174. Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalhovde JM and Schiaffino S 2002. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 9213-9218.
175. Papatoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang SL, Stark K and Wold B 1995. Disruption of the Mouse Mrf4 Gene Identifies Multiple Waves of Myogenesis in the Myotome. *Development* 121, 3347-3358.
176. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM and Huard J 2007. Stem and Progenitor Cells in Skeletal Muscle Development, Maintenance, and Therapy. *Mol Ther* 15, 867-877.
177. Philip B, Lu Z and Gao Y 2005. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cellular Signalling* 17, 365-375.
178. Picard B, Gagnière H, Robelin J and Geay Y 1995. Comparison of the foetal development of muscle in normal and double-muscled cattle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 16, 629-639.
179. Picard B, Lefaucheur L, Berri C and Duclos J-M 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development* 42, 415-431.
180. Picard B, Duris M-P, Jurie C. 1998. Caractérisation des chaînes lourdes de myosine dans le muscle de bovin. *INRA Prod. Anim.* 11, 150-152.
181. Pollack GH 1990. In: *Muscles and Molecules*, 3th Edn. Seattle: Ebner and Sons. . 300, pp. 221-222.
182. Rabilloud T 2009. Membrane proteins and proteomics: Love is possible, but so difficult. *Electrophoresis* 30, S174-S180.
183. Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ and Attisano L 2003. Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor  $\beta$ -Like Signaling Pathway To Block Adipogenesis. In, pp. 7230-7242. *American Society for Microbiology*.



184. Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ and Gonzalez-Cadavid NF 2003. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285, E876-888.
185. Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, Mansouri A, Cumano A and Buckingham M 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* 172, 91-102.
186. Rescan PY, Jutel I and Ralliere C 2001. Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204, 3523-3529.
187. Reynaud EG, Pospel K, Guillier M, Leibovitch MP and Leibovitch SA 1999. p57Kip2 Stabilizes the MyoD Protein by Inhibiting Cyclin E-Cdk2 Kinase Activity in Growing Myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7621-7629.
188. Ríos R, Carneiro I, Arce VM and Devesa J 2001. Myostatin Regulates Cell Survival during C2C12 Myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 561-566.
189. Ríos R, Carneiro I, Arce VM and Devesa J 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C993-999.
190. Robelin J, Picard B, Lustrat A, Jurie C, Baroiron C, Pons F and Geay Y 1993. Myosin transitions in Semitendinosus muscle during foetal development of cattle: Immunocytochemical and electrophoretic analyses. *Reprod Nutr Develop* 33, 25-41.
191. Roberts AB and Sporn MB 1993. Physiological Actions and Clinical-Applications of Transforming Growth-Factor-Beta (Tgf-Beta). *Growth Factors* 8, 1-9.
192. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD and Glass DJ 2001. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol* 3, 1009 - 1013.
193. Rothe M, Sarma V, Dixit VM and Goeddel DV 1995. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *SCIENCE* 269, 1424-1427.
194. Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S and Jaenisch R 1992. Inactivation of Myod in Mice Leads to up-Regulation of the Myogenic Hlh Gene Myf-5 and Results in Apparently Normal Muscle Development. *Cell* 71, 383-390.
195. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I and Totsuka T 2000. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1497, 77-88.
196. Salehian B, Mahabadi V, Bilas J, Taylor WE and Ma K 2006. The effect of glutamine on prevention of glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with myostatin suppression. *Metabolism* 55, 1239-1247.
197. Salerno MS, Thomas M, Forbes D, Watson T, Kambadur R and Sharma M 2004. Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C1031-1040.
198. Sandri M and Carraro U 1999. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 1373-1390.



199. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL and Spiegelman BM 2006. PGC-1 $\beta$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 16260-16265.
200. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH and Goldberg AL 2004. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell* 117, 399-412.
201. Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H and Buckingham M 1989. Expression of 2 Myogenic Regulatory Factors Myogenin and Myod1 During Mouse Embryogenesis. *Nature* 341, 303-307.
202. Sazanov A, Ewald D, Buitkamp J and Fries R 1999. A molecular marker for the chicken myostatin gene (GDF8) maps to 7p11. *Animal Genetics* 30, 388-389.
203. Schakman O, Gilson H and Thissen JP 2008. Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy. *J Endocrinol* 197, 1-10.
204. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K and LØmo T 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 10, 197-205.
205. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF and Lee S-J 2004. Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N Engl J Med* 350, 2682-2688.
206. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P and Rudnicki MA 2000. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* 102, 777-786.
207. Sharma M, Kambadur R, Matthews BG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ and Bass JJ 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *Journal of Cellular Physiology* 180, 1-9.
208. Shi Y and Massagué J 2003. Mechanisms of TGF- $\beta$  Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113, 685-700.
209. Shibata M, Matsumoto K, Aikawa K, Muramoto T, Fujimura S and Kadowaki M 2006. Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese Black Cattle. *J. Anim Sci.* 84, 2983-2989.
210. Skapek SX, Rhee J, Kim PS, Novitch BG and Lassar AB 1996. Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7043-7053.
211. Smith TPL, Lopez-Corrales NL, Kappes SM and Sonstegard TS 1997. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mammalian Genome* 8, 742-744.
212. Sonstegard TS, Rohrer GA and Smith TPL 1998. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Animal Genetics* 29, 19-22.
213. Southgate RJ, Neill B, Prelovsek O, El-Osta A, Kamei Y, Miura S, Ezaki O, McLoughlin TJ, Zhang W, Unterman TG and Febbraio MA 2007. FOXO1 Regulates the Expression of 4E-BP1 and Inhibits mTOR Signaling in Mammalian Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 282, 21176-21186.





214. Spencer MJ, Walsh C, Dorshkind KA, Rodriguez EM and Tidball JG 1997. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *Clinical Investigation* 99, 2745-2751.
215. Sporn MB and Roberts AB 1990. Regulation of Cell Differentiation and Proliferation by Retinoids and Transforming Growth Factor Beta. In Burger, M. M., B. Sordat and R. M. Zinkernagel, pp. 2-15.
216. Steelman CA, Recknor JC, Nettleton D and Reecy JM 2006. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *Faseb J* 20, 580 - 582.
217. Stern HM, Lin-Jones J and Hauschka SD 1997. Synergistic interactions between bFGF and a TGF-beta family member may mediate myogenic signals from the neural tube. *Development* 124, 3511-3523.
218. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD and Glass DJ 2004. The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. *Molecular Cell* 14, 395-403.
219. Stockdale FE and Miller JB 1987. The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avian skeletal muscles. *Developmental Biology* 123, 1-9.
220. Szabo G, Dallmann G, Muller G, Patthy L, Soller M and Varga L 1998. A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mammalian Genome* 9, 671-672.
221. Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G and Buckingham M 1997. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89, 127-138.
222. Tajbakhsh S, Bober E, Babinet C, Pournin S, Arnold H and Buckingham M 1996. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. *Developmental Dynamics* 206, 291-300.
223. Tajbakhsh S, Borello U, Vivarelli E, Kelly R, Papkoff J, Duprez D, Buckingham M and Cossu G 1998. Differential activation of Myf5 and MyoD by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of Myf5. *Development* 125, 4155-4162.
224. Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH, Jr., Kull FC, Jr. and Gonzalez-Cadavid N 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E221-228.
225. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R 2000. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 40235-40243.
226. Timothy KM and Antonio G 1998. TRAF2 expression in differentiated muscle. *Journal of Cellular Biochemistry* 71, 461-466.
227. Tries RS, Chen T, Da Vies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA and Wolfman NM 2001. Gdf-8 Propeptide Binds to GDF-8 and Antagonizes Biological Activity by Inhibiting GDF-8 Receptor Binding. *Growth Factors* 18, 251 - 259.



228. Tusher VG, Tibshirani R and Chu G 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-5121.
229. Tzahor E 2009. Heart and craniofacial muscle development: A new developmental theme of distinct myogenic fields. *Developmental Biology* 327, 273-279.
230. Valin C 1985. Les protéases des viandes. In *Hydrolases et dépolymérasés*. Edited by A. Mouranche & C. Costes. Paris: Gauthier-Villars., 279-312.
231. Venters SJ, Argent RE, Deegan FM, Perez-Baron G, Wong TS, Tidyman WE, Denetclaw WF, Marcelle C, Bronner-Fraser M and Ordahl CP 2004. Precocious terminal differentiation of premigratory limb muscle precursor cells requires positive signalling. *Developmental Dynamics* 229, 591-599.
232. Voermans NC, Bönnemann CG, Huijing PA, Hamel BC, van Kuppevelt TH, de Haan A, Schalkwijk J, van Engelen BG and Jenniskens GJ 2008. Clinical and molecular overlap between myopathies and inherited connective tissue diseases. *Neuromuscular Disorders* 18, 843-856.
233. Wagner KR, Liu X, Chang X and Allen RE 2005. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2519-2524.
234. Walls EW 1960. The microanatomy of muscle. In *The Structure and Function of Muscle*. 1, 21-62. Edited by G. H. Bourne. New York: Academic Press INC.
235. Walsh K 1997. Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Progress in cell cycle research* 3, 53-58.
236. Walsh K and Perlman H 1997. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development* 7, 597-602.
237. Wang HX, Zhang Q and Zhu DH 2003. hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 877-883.
238. Wang J and Walsh K 1996. Resistance to Apoptosis Conferred by Cdk Inhibitors During Myocyte Differentiation. *SCIENCE* 273, 359-361.
239. Webster C and Blau HM 1990. Accelerated Age-Related Decline in Replicative Life-Span of Duchenne Muscular-Dystrophy Myoblasts - Implications for Cell and Gene-Therapy. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 16, 557-565.
240. Wegner J, Albrecht E, Fiedler I, Teuscher F, Papstein HJ and Ender K 2000. Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *J. Anim Sci.* 78, 1485-1496.
241. Wehling M, Cai BY and Tidball JG 2000. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB Journal* 14, 103-110.
242. Welle S 2002. Cellular and molecular basis of age-related sarcopenia. *Can J Appl Physiol.* 27, 19-41.
243. Welle S, Burgess K and Mehta S 2009a. Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E567-572.



244. Welle S, Cardillo A, Zanche M and Tawil R 2009b. Skeletal muscle gene expression after myostatin knockout in mature mice. *Physiol. Genomics* 38, 342-350.
245. Weydert A, Barton P, Harris AJ, Pinset C and Buckingham M 1987. Developmental pattern of mouse skeletal myosin heavy chain gene transcripts in vivo and in vitro. *Cell* 49, 121-129.
246. Weyman CM and Wolfman A 1998. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MEK) Activity Is Required for Inhibition of Skeletal Muscle Differentiation by Insulin-Like Growth Factor 1 or Fibroblast Growth Factor 2. *Endocrinology* 139, 1794-1800.
247. Whitman M 1998. Smads and early developmental signaling by the TGF $\beta$  superfamily. *Genes & Development* 12, 2445-2462.
248. Whittemore L-A, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan X-Y, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L and Wolfman NM 2003. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300, 965-971.
249. Wigmore PM and Evans DJR 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. *International review of cytology* 216, 175-232.
250. Wilson SJ, McEwan JC, Sheard PW and Harris AJ 1992. Early Stages of Myogenesis in a Large Mammal - Formation of Successive Generations of Myotubes in Sheep Tibialis Cranialis Muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 13, 534-550.
251. Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS and Leet SI 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15842-15846.
252. Xu C, Wu G, Zohar Y and Du SJ 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 206, 4067-4079.
253. Yan Z and Williams RS 2006. Skeletal Muscle Hypertrophy and Response to Training. In *Principles of Molecular Medicine*, pp. 688-692.
254. Yang W, Zhang Y, Li Y, Wu Z and Zhu D 2007. Myostatin Induces Cyclin D1 Degradation to Cause Cell Cycle Arrest through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-3 $\beta$  Pathway and Is Antagonized by Insulin-like Growth Factor 1. *J. Biol. Chem.* 282, 3799-3808.
255. Yang W, Zhang Y, Ma G, Zhao X, Chen Y and Zhu D 2005. Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326, 660-666.
256. Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N and Zhu D 2006. Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Is Involved in Myostatin-Regulated Differentiation Repression. *Cancer Res* 66, 1320-1326.
257. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY and Baltimore D 1997. Daxx, a Novel Fas-Binding Protein That Activates JNK and Apoptosis. *Cell* 89, 1067-1076.
258. Yang ZZ, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D and Hemmings BA 2004. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochemical Society Transactions* 32, 350-354.



259. Yeh W-C, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV and Mak TW 1997. Early Lethality, Functional NF- $\kappa$ B Activation, and Increased Sensitivity to TNF-Induced Cell Death in TRAF2-Deficient Mice. *Immunity* 7, 715-725.
260. Yuzawa H, Koinuma D, Maeda S, Yamamoto K, Miyazawa K and Imamura T 2009. Arkadia represses the expression of myoblast differentiation markers through degradation of Ski and the Ski-bound Smad complex in C2C12 myoblasts. *Bone* 44, 53-60.
261. Zhang P, Wong C, Liu D, Finegold M, Harper JW and Elledge SJ 1999. p21CIP1 and p57KIP2 control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes & Development* 13, 213-224.
262. Zhang W, Behringer RR and Olson EN 1995. Inactivation of the Myogenic Bhlh Gene Mrf4 Results in up-Regulation of Myogenin and Rib Anomalies. *Genes & Development* 9, 1388-1399.
263. Zhu X, Topouzis S, Liang LF and Stotish RL 2004. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* 26, 262 - 272.
264. Zimmerman CM and Padgett RW 2000. Transforming growth factor [beta] signaling mediators and modulators. *Gene* 249, 17-30.
265. Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM and Lee S-J 2002. Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. *SCIENCE* 296, 1486-1488.





# *Résumés*



L'hypertrophie musculaire a fait l'objet de nombreux travaux chez les animaux producteurs de viande. Elle s'accompagne généralement d'une augmentation du nombre total de fibres, en particulier des fibres glycolytiques rapides, et d'une faible teneur en collagène. Ceci est favorable à un rendement élevé en viande, et à une meilleure tendreté de la viande au détriment de sa saveur. Chez les bovins culards, une mutation perte de fonction du gène codant pour la myostatine (MSTN) est responsable de cette hypertrophie. Ce facteur de croissance de la superfamille des TGF- $\beta$ , régule négativement la croissance et la masse du muscle squelettique en contrôlant le nombre de fibres par son action anti-proliférative, et la croissance individuelle de chacune d'entre elles. Dans le but de compléter les connaissances sur ses mécanismes d'action, ce travail de thèse (2006-2009) avait pour objectif d'identifier de nouvelles cibles moléculaires de la myostatine pouvant être impliquées dans l'hypertrophie musculaire.

La première étape de ce travail a consisté à analyser le protéome et le transcriptome du muscle *Quadriceps* de souris présentant une inactivation du gène de la MSTN (KO MSTN) et de leurs témoins (collaboration avec J. Reecy, Université Iowa, USA). Les protéines et les gènes différentiels, candidats pour être cibles potentielles de la myostatine, ont été validés par Western-blot et/ou qPCR. Cette étude a révélé notamment une activation de la cascade PI3K/Akt, une expression différentielle de gènes et de protéines impliqués dans la régulation de la survie cellulaire (augmentation des facteurs de survie cellulaire/anti-apoptotiques) (Publication 1).

Dans une deuxième étape de ce travail, j'ai mesuré l'abondance des transcrits et/ou des protéines impliqués dans l'apoptose (mort cellulaire programmée) et quantifié les noyaux apoptotiques en mesurant le taux de la fragmentation de l'ADN sur coupes de muscle. Les résultats montrent une diminution de l'expression des facteurs pro-apoptotiques et du taux de noyaux apoptotiques démontrant une inhibition de l'apoptose des noyaux musculaires en l'absence de myostatine fonctionnelle (Publication 2).

La troisième étape a été consacrée à la validation de ces résultats chez les Bovins culards en utilisant des techniques de référence (Western-blot et qPCR). Cette étude a confirmé l'existence de signatures moléculaires et de mécanismes similaires à ceux identifiés chez la Souris (Publication 3).

L'ensemble de ces résultats est en faveur d'une augmentation de la survie des noyaux, et par conséquent de la taille du domaine nucléo-cytoplasmique, un déterminant important pour la synthèse protéique. Ce mécanisme pourrait contribuer au phénomène d'hypertrophie musculaire chez les animaux présentant une inactivation de la MSTN.

**Mots-clés** : Myostatine, Muscle, Transcriptome, Protéome, Hypertrophie, Souris, Bovin, Apoptose.



Muscle hypertrophy has been extensively studied in meat producing animals. It is generally due to an increase in the total number of fibres, especially, of fast glycolytic fibres and associated to lower collagen content and lower intramuscular fat level. This is favourable to high meat yield and greater tenderness but detrimental to meat flavour. In double-musced (DM) cattle, a loss-of-function mutation in the myostatin gene (MSTN) is responsible for muscle hypertrophy. This member of Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ ) superfamily negatively regulates skeletal muscle mass growth by controlling the number of fibres through its anti-proliferative activity, and the size of individual fibres. In order to get a thorough knowledge of the molecular mechanisms of myostatin action, my PhD thesis (2006-2009) aimed to identify myostatin targets of this growth factor that may be involved in the regulation of muscle hypertrophy.

In a first part of this work, I analysed the proteomic and transcriptomic profiles in the muscle of MSTN-null mice and their control littermates (collaboration with J. Reecy, Iowa University, USA). Differential expression of genes and proteins, considered as putative molecular targets of MSTN inactivation, was confirmed by Western-blot and by qPCR. This study revealed an activation of the PI3K/Akt pathway and a differential expression of genes and proteins involved in cell survival (increase in cell survival /anti-apoptotic factors) (Publication 1).

In a second part of this work, I analysed the abundance of transcripts and/or proteins involved in the apoptosis (programmed cell death) pathway and quantified apoptotic nuclei by measuring the DNA fragmentation index in cross sections of the muscle. I showed a decrease of pro-apoptotic factor expression and of apoptotic nuclear index illustrating attenuation of muscle nuclei apoptosis in the context of MSTN inactivation (Publication 2).

The third part of this work was the validation of mice data in DM cattle using reference techniques (Western-blot and qPCR). This study confirmed the existence of molecular signatures and mechanisms similar to those identified in mice (Publication 3).

Altogether, the data presented here showed an increase of myonuclei survival and hence the size of nucleo-cytoplasmic domain, an important determinant for protein synthesis. This mechanism could contribute to muscular hypertrophy in animals which presented MSTN inactivation.

**Key-words:** Myostatin, Muscle, Transcriptome, Proteome, Hypertrophy, Mice, Cattle, Apoptosis.



# *Annexes*





**Additional file 1.**

**Up-regulated gene list with fold change (FC).**

<b>Gene Name</b>	<b>FC</b>	<b>Gene Name</b>	<b>FC</b>	<b>Gene Name</b>	<b>FC</b>	<b>Gene Name</b>	<b>FC</b>
<a href="#">ANXA6</a>	1.30	<a href="#">Alk</a>	1.10	<a href="#">DAD1</a>	1.10	<a href="#">MGC2793</a>	1.10
<a href="#">ITPK1</a>	1.30	<a href="#">AMPD3</a>	1.10	<a href="#">Disp</a>	1.10	<a href="#">MGC2817</a>	1.10
<a href="#">1700026M20Rik</a>	1.20	<a href="#">Ang</a>	1.10	<a href="#">DMBT1</a>	1.10	<a href="#">MINK</a>	1.10
<a href="#">2610312B22Rik</a>	1.20	<a href="#">Atp6v0a4</a>	1.10	<a href="#">Dpf3</a>	1.10	<a href="#">MO25</a>	1.10
<a href="#">5830475F03Rik</a>	1.20	<a href="#">ATP6V1F</a>	1.10	<a href="#">DTYMK</a>	1.10	<a href="#">Mre11a</a>	1.10
<a href="#">AARS</a>	1.20	<a href="#">Atpi</a>	1.10	<a href="#">Eef1b2</a>	1.10	<a href="#">MRPL15</a>	1.10
<a href="#">Abcd3</a>	1.20	<a href="#">B:0792</a>	1.10	<a href="#">EFNA4</a>	1.10	<a href="#">MYLI</a>	1.10
<a href="#">Actb</a>	1.20	<a href="#">B:7699</a>	1.10	<a href="#">Ehd3</a>	1.10	<a href="#">Npm1</a>	1.10
<a href="#">Alas1</a>	1.20	<a href="#">B4galt6</a>	1.10	<a href="#">EIF3S10</a>	1.10	<a href="#">Opsr1</a>	1.10
<a href="#">BCL7A</a>	1.20	<a href="#">Banp</a>	1.10	<a href="#">ELN</a>	1.10	<a href="#">Ovgp1</a>	1.10
<a href="#">C:7761</a>	1.20	<a href="#">BIRC5</a>	1.10	<a href="#">FAM13C1</a>	1.10	<a href="#">P4HB</a>	1.10
<a href="#">CLONEIGA5135IMM</a>	1.20	<a href="#">Btnd4</a>	1.10	<a href="#">Fancd1</a>	1.10	<a href="#">PDE5A</a>	1.10
<a href="#">CPD</a>	1.20	<a href="#">C:1860</a>	1.10	<a href="#">FBLN5</a>	1.10	<a href="#">PDE6B</a>	1.10
<a href="#">D630041K24Rik</a>	1.20	<a href="#">C:1947</a>	1.10	<a href="#">FLJ10901</a>	1.10	<a href="#">PDF</a>	1.10
<a href="#">DKFZP564K1964</a>	1.20	<a href="#">C:2111</a>	1.10	<a href="#">FLJ10956</a>	1.10	<a href="#">Pdha1</a>	1.10
<a href="#">ENSG00000029271</a>	1.20	<a href="#">C:3400</a>	1.10	<a href="#">FLJ11151</a>	1.10	<a href="#">Pecam</a>	1.10
<a href="#">FAM14A</a>	1.20	<a href="#">C:3700</a>	1.10	<a href="#">FLJ12132</a>	1.10	<a href="#">PEX11B</a>	1.10
<a href="#">FGF6</a>	1.20	<a href="#">C:3969</a>	1.10	<a href="#">FLJ20356</a>	1.10	<a href="#">PHIP</a>	1.10
<a href="#">GALR2</a>	1.20	<a href="#">C:5888</a>	1.10	<a href="#">FLJ20574</a>	1.10	<a href="#">PHOX2B</a>	1.10
<a href="#">KCNC4</a>	1.20	<a href="#">C:7436</a>	1.10	<a href="#">Foxa3</a>	1.10	<a href="#">Phxr2</a>	1.10
<a href="#">LTB4R</a>	1.20	<a href="#">C:7950</a>	1.10	<a href="#">FUBP3</a>	1.10	<a href="#">PIK3CG</a>	1.10
<a href="#">MEF2C</a>	1.20	<a href="#">C:8496</a>	1.10	<a href="#">G6PD</a>	1.10	<a href="#">PIK3R3</a>	1.10
<a href="#">Nr4a2</a>	1.20	<a href="#">C:8792</a>	1.10	<a href="#">Gabrq</a>	1.10	<a href="#">PINK1</a>	1.10
<a href="#">Odz3</a>	1.20	<a href="#">C10orf3</a>	1.10	<a href="#">Gas1</a>	1.10	<a href="#">PLA2G6</a>	1.10
<a href="#">Pdc6</a>	1.20	<a href="#">C11ORF10</a>	1.10	<a href="#">Gclc</a>	1.10	<a href="#">PLCG1</a>	1.10
<a href="#">Pdlim1</a>	1.20	<a href="#">C14ORF140</a>	1.10	<a href="#">GMFG</a>	1.10	<a href="#">Pmp22</a>	1.10
<a href="#">PNUTL2</a>	1.20	<a href="#">C14ORF91</a>	1.10	<a href="#">GNRPX</a>	1.10	<a href="#">Ppox</a>	1.10
<a href="#">Postn</a>	1.20	<a href="#">CCL20</a>	1.10	<a href="#">Gpr39</a>	1.10	<a href="#">Ppp4c</a>	1.10
<a href="#">Ppp1cb</a>	1.20	<a href="#">CCL22</a>	1.10	<a href="#">Grm8</a>	1.10	<a href="#">PRKAR1B</a>	1.10
<a href="#">PVALB</a>	1.20	<a href="#">CCND3</a>	1.10	<a href="#">GTF3C1</a>	1.10	<a href="#">PRO2831</a>	1.10
<a href="#">SEMA3A</a>	1.20	<a href="#">CCR7</a>	1.10	<a href="#">GUK1</a>	1.10	<a href="#">PRO2958</a>	1.10
<a href="#">1600015H20Rik</a>	1.10	<a href="#">CD164</a>	1.10	<a href="#">Gyg1</a>	1.10	<a href="#">Prps1</a>	1.10
<a href="#">1700016D08Rik</a>	1.10	<a href="#">CDH8</a>	1.10	<a href="#">H2BFS</a>	1.10	<a href="#">PRSS11</a>	1.10
<a href="#">1700080G18Rik</a>	1.10	<a href="#">CERCAM</a>	1.10	<a href="#">Hebp1</a>	1.10	<a href="#">Psmc5</a>	1.10
<a href="#">2310047C04Rik</a>	1.10	<a href="#">Cfi</a>	1.10	<a href="#">HGAK026713</a>	1.10	<a href="#">Ptgfr</a>	1.10
<a href="#">2410001H17Rik</a>	1.10	<a href="#">CFL2</a>	1.10	<a href="#">Hp</a>	1.10	<a href="#">PTPRF</a>	1.10
<a href="#">2810036M19Rik</a>	1.10	<a href="#">CHAF1B</a>	1.10	<a href="#">Inpp1</a>	1.10	<a href="#">Rad50</a>	1.10
<a href="#">4833424P18Rik</a>	1.10	<a href="#">Cherp</a>	1.10	<a href="#">KCNJ15</a>	1.10	<a href="#">RAN</a>	1.10
<a href="#">5830411K18Rik</a>	1.10	<a href="#">CKAP4</a>	1.10	<a href="#">Khdrbs3</a>	1.10	<a href="#">Reck</a>	1.10
<a href="#">6720473M11Rik</a>	1.10	<a href="#">CLONE82T-CELLRE</a>	1.10	<a href="#">KIAA1430</a>	1.10	<a href="#">RLUCL</a>	1.10
<a href="#">9330197E15Rik</a>	1.10	<a href="#">CLONEIGA5487IMM</a>	1.10	<a href="#">Kng</a>	1.10	<a href="#">RNF29</a>	1.10
<a href="#">A2BP1</a>	1.10	<a href="#">Col4a4</a>	1.10	<a href="#">Limd1</a>	1.10	<a href="#">RPL18</a>	1.10
<a href="#">Abl1</a>	1.10	<a href="#">Copz1</a>	1.10	<a href="#">LOC150580</a>	1.10	<a href="#">RPS17</a>	1.10
<a href="#">ACTG1</a>	1.10	<a href="#">Csnk2a1</a>	1.10	<a href="#">LOC51039</a>	1.10	<a href="#">RTN4</a>	1.10
<a href="#">Actg2</a>	1.10	<a href="#">CTNS</a>	1.10	<a href="#">LOXL1</a>	1.10	<a href="#">S100A10</a>	1.10
<a href="#">ADH1B</a>	1.10	<a href="#">Ctps2</a>	1.10	<a href="#">LRP1</a>	1.10	<a href="#">SALPR</a>	1.10
<a href="#">AGER</a>	1.10	<a href="#">CTSL</a>	1.10	<a href="#">MADH6</a>	1.10	<a href="#">SFRS7</a>	1.10
<a href="#">Aldh3a2</a>	1.10	<a href="#">CTSS</a>	1.10	<a href="#">MAP2K7</a>	1.10	<a href="#">SLC6A6</a>	1.10



## Additional file 2.

### Down-regulated gene list with fold change (FC).

Gene Name	FC	Gene Name	FC	Gene Name	FC	Gene Name	FC
<a href="#">PRKACG</a>	1.60	<a href="#">2310005C01Rik</a>	1.10	<a href="#">Dct</a>	1.10	<a href="#">KIAA1357</a>	1.10
<a href="#">1700019B01Rik</a>	1.50	<a href="#">2310035C23Rik</a>	1.10	<a href="#">Ddost</a>	1.10	<a href="#">Klf4</a>	1.10
<a href="#">Cd68</a>	1.50	<a href="#">2610305J24Rik</a>	1.10	<a href="#">DHFR</a>	1.10	<a href="#">KLF5</a>	1.10
<a href="#">1700123D08Rik</a>	1.40	<a href="#">3300002A11Rik</a>	1.10	<a href="#">Dhx33</a>	1.10	<a href="#">KLRC2</a>	1.10
<a href="#">2410116I05Rik</a>	1.40	<a href="#">4631422O05Rik</a>	1.10	<a href="#">DJ971N18.2</a>	1.10	<a href="#">KRT13</a>	1.10
<a href="#">4930428F12Rik</a>	1.30	<a href="#">4921524L21Rik</a>	1.10	<a href="#">DMD</a>	1.10	<a href="#">Krtap14</a>	1.10
<a href="#">4930519N16Rik</a>	1.30	<a href="#">4930557A04Rik</a>	1.10	<a href="#">DNAI1</a>	1.10	<a href="#">LAIR1</a>	1.10
<a href="#">ADAMTS10</a>	1.30	<a href="#">4931400O07Rik</a>	1.10	<a href="#">DNASE1L1</a>	1.10	<a href="#">LEF1</a>	1.10
<a href="#">C:9240</a>	1.30	<a href="#">4931421K24Rik</a>	1.10	<a href="#">DRIL1</a>	1.10	<a href="#">LHFP</a>	1.10
<a href="#">CXCR3</a>	1.30	<a href="#">4932408F18Rik</a>	1.10	<a href="#">DSCR1L2</a>	1.10	<a href="#">Limk1</a>	1.10
<a href="#">LOC162427</a>	1.30	<a href="#">6030422M01Rik</a>	1.10	<a href="#">Egfl6</a>	1.10	<a href="#">LIMS2</a>	1.10
<a href="#">Mfn1</a>	1.30	<a href="#">8430408H12Rik</a>	1.10	<a href="#">EMP3</a>	1.10	<a href="#">LIPG</a>	1.10
<a href="#">MurinemRNAforT</a>	1.30	<a href="#">9230102M18Rik</a>	1.10	<a href="#">ENSG00000024600</a>	1.10	<a href="#">LNK</a>	1.10
<a href="#">P5cr2</a>	1.30	<a href="#">9430022F06Rik</a>	1.10	<a href="#">ENSG00000028410</a>	1.10	<a href="#">LOC151094</a>	1.10
<a href="#">1500031A17Rik</a>	1.20	<a href="#">A:04413</a>	1.10	<a href="#">ENSG00000034299</a>	1.10	<a href="#">LOC93064</a>	1.10
<a href="#">2700046G09Rik</a>	1.20	<a href="#">Abca4</a>	1.10	<a href="#">ENSG00000041752</a>	1.10	<a href="#">Mist1</a>	1.10
<a href="#">3300001M08Rik</a>	1.20	<a href="#">ADORA2A</a>	1.10	<a href="#">ENSG00000041951</a>	1.10	<a href="#">MMP3</a>	1.10
<a href="#">4930549C01Rik</a>	1.20	<a href="#">Ahr</a>	1.10	<a href="#">Epha2</a>	1.10	<a href="#">MMPL1</a>	1.10
<a href="#">4932432N11Rik</a>	1.20	<a href="#">AI159731</a>	1.10	<a href="#">Ethe1</a>	1.10	<a href="#">MOR104-4</a>	1.10
<a href="#">Ambp</a>	1.20	<a href="#">AI790298</a>	1.10	<a href="#">ETV7</a>	1.10	<a href="#">MOR155-2</a>	1.10
<a href="#">Atp7a</a>	1.20	<a href="#">Akr1e1</a>	1.10	<a href="#">F2</a>	1.10	<a href="#">MOR170-3</a>	1.10
<a href="#">CA3</a>	1.20	<a href="#">ANK3</a>	1.10	<a href="#">FAP</a>	1.10	<a href="#">MOR278-1</a>	1.10
<a href="#">CCL19</a>	1.20	<a href="#">APBB2</a>	1.10	<a href="#">FEZL</a>	1.10	<a href="#">MOR34-2</a>	1.10
<a href="#">CPSF4</a>	1.20	<a href="#">Apoe</a>	1.10	<a href="#">FLJ10565</a>	1.10	<a href="#">Mrg2</a>	1.10
<a href="#">CR2gene</a>	1.20	<a href="#">APOL6</a>	1.10	<a href="#">Gata1</a>	1.10	<a href="#">MST1</a>	1.10
<a href="#">CTSK</a>	1.20	<a href="#">ARPC4</a>	1.10	<a href="#">GATM</a>	1.10	<a href="#">MT3</a>	1.10
<a href="#">Cyp2j6</a>	1.20	<a href="#">Atm</a>	1.10	<a href="#">GFI1B</a>	1.10	<a href="#">Mtch1</a>	1.10
<a href="#">D8Ertd354e</a>	1.20	<a href="#">ATP5G3</a>	1.10	<a href="#">Ggh</a>	1.10	<a href="#">MYO6</a>	1.10
<a href="#">Ddx19</a>	1.20	<a href="#">B4galt2</a>	1.10	<a href="#">GNG5</a>	1.10	<a href="#">NAG18</a>	1.10
<a href="#">Dhx36</a>	1.20	<a href="#">BC018601</a>	1.10	<a href="#">Gpm6a</a>	1.10	<a href="#">NAP1</a>	1.10
<a href="#">FLJ12547</a>	1.20	<a href="#">Bklhd2</a>	1.10	<a href="#">Grb10</a>	1.10	<a href="#">Niban</a>	1.10
<a href="#">FLJ21924</a>	1.20	<a href="#">BSG</a>	1.10	<a href="#">Gsto1</a>	1.10	<a href="#">Nolc1</a>	1.10
<a href="#">FRZB</a>	1.20	<a href="#">C:2400</a>	1.10	<a href="#">GTPBP2</a>	1.10	<a href="#">NPPB</a>	1.10
<a href="#">Gsk3b</a>	1.20	<a href="#">C:3409</a>	1.10	<a href="#">Gus</a>	1.10	<a href="#">NSEP1</a>	1.10
<a href="#">Icam4</a>	1.20	<a href="#">C:8770</a>	1.10	<a href="#">Hand1</a>	1.10	<a href="#">Ofd1</a>	1.10
<a href="#">IL17</a>	1.20	<a href="#">C11ORF17</a>	1.10	<a href="#">HDLBP</a>	1.10	<a href="#">OGT</a>	1.10
<a href="#">KIAA0196</a>	1.20	<a href="#">C17ORF31</a>	1.10	<a href="#">Heph</a>	1.10	<a href="#">OPRK1</a>	1.10
<a href="#">LAMC3</a>	1.20	<a href="#">Cd5</a>	1.10	<a href="#">HGAF128541</a>	1.10	<a href="#">ORM1</a>	1.10
<a href="#">Ldh2</a>	1.20	<a href="#">Cdc26</a>	1.10	<a href="#">HGBC004969</a>	1.10	<a href="#">OTOR</a>	1.10
<a href="#">M11S1</a>	1.20	<a href="#">CDT6</a>	1.10	<a href="#">HGNM_005839</a>	1.10	<a href="#">Pabpc1</a>	1.10
<a href="#">Muscarolicytoch</a>	1.20	<a href="#">CGI-69</a>	1.10	<a href="#">HGS</a>	1.10	<a href="#">PDE1B</a>	1.10
<a href="#">Musmacedonicusc</a>	1.20	<a href="#">CGR11</a>	1.10	<a href="#">HPIP</a>	1.10	<a href="#">PHC2</a>	1.10
<a href="#">Ndufa10</a>	1.20	<a href="#">Clca4</a>	1.10	<a href="#">HRC</a>	1.10	<a href="#">Pik3r4</a>	1.10
<a href="#">Ndufb9</a>	1.20	<a href="#">CLONE017D02MY02</a>	1.10	<a href="#">Hrg</a>	1.10	<a href="#">PLA2G7</a>	1.10
<a href="#">NEB</a>	1.20	<a href="#">CLONEB320UT-CEL</a>	1.10	<a href="#">HRH2</a>	1.10	<a href="#">PMM2</a>	1.10
<a href="#">Og9x</a>	1.20	<a href="#">COL18A1</a>	1.10	<a href="#">HTR2A</a>	1.10	<a href="#">POLD2</a>	1.10
<a href="#">ORMDL2</a>	1.20	<a href="#">Col4a2</a>	1.10	<a href="#">IL23A</a>	1.10	<a href="#">POMT2</a>	1.10
<a href="#">Ors18</a>	1.20	<a href="#">COL6A1</a>	1.10	<a href="#">IL24</a>	1.10	<a href="#">Pou5f1</a>	1.10
<a href="#">Ptpn12</a>	1.20	<a href="#">COL6A1</a>	1.10	<a href="#">Irf3</a>	1.10	<a href="#">Rab15</a>	1.10
<a href="#">RNF5</a>	1.20	<a href="#">COX5A</a>	1.10	<a href="#">ITGA9</a>	1.10	<a href="#">Rab6</a>	1.10



<a href="#">RPIP8</a>	1.20	<a href="#">Cox6c</a>	1.10	<a href="#">ITGB8</a>	1.10	<a href="#">RNF34</a>	1.10
<a href="#">SLC5A5</a>	1.20	<a href="#">Cxcl13</a>	1.10	<a href="#">JAK1</a>	1.10	<a href="#">Rnpc2</a>	1.10
<a href="#">1300017E09Rik</a>	1.10	<a href="#">Cxcl15</a>	1.10	<a href="#">K-ALPHA-1</a>	1.10	<a href="#">SCNN1B</a>	1.10
<a href="#">1700029M23Rik</a>	1.10	<a href="#">Cyp2a5</a>	1.10	<a href="#">Khk</a>	1.10	<a href="#">SDCCAG1</a>	1.10
<a href="#">1700125F08Rik</a>	1.10	<a href="#">Cyp2c40</a>	1.10	<a href="#">KIAA0748</a>	1.10	<a href="#">SEC13L1</a>	1.10
<a href="#">1810011E08Rik</a>	1.10	<a href="#">Dap3</a>	1.10	<a href="#">KIAA1324</a>	1.10	<a href="#">SLC38A3</a>	1.10

