HAL
open science

Étude du rôle des protéines GASP dans le développement musculaire par des approches in vivo et de prédiction in silico

Victor Gondran Tellier

To cite this version:

Victor Gondran Tellier. Étude du rôle des protéines GASP dans le développement musculaire par des approches in vivo et de prédiction in silico. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0099 . tel-01962945

HAL Id: tel-01962945

https://theses.hal.science/tel-01962945v1

Submitted on 21 Dec 2018

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.

Thèse de doctorat

Université de Limoges

Université de Limoges

École Doctorale Bio-Santé (ED 524)

Unité de Génétique Moléculaire Animale UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée et soutenue par

Victor Gondran Tellier

Le 20 décembre 2016

Étude du rôle des protéines GASP dans le développement musculaire par des approches *in vivo* et de prédiction *in silico*

Thèse dirigée par le Professeur Véronique BLANQUET et le Docteur Laetitia MAGNOL

JURY :

Président du jury

M. Fabrice LALLOUE, Professeur des Universités, Limoges

Rapporteurs

M. Jean-Luc VILOTTE, Directeur de Recherche, INRA, Jouy-en-Josas

M. François ERARD, Professeur des Universités, Orléans

Examinateurs

Mme. Stéphanie LERONDEL, Ingénieur de Recherche, HDR.CNRS, Orléans

Mme. Laetitia MAGNOL, Maître de Conférences, Limoges

Mme. Véronique BLANQUET, Professeur des Universités, Limoges

Rien n’est jamais perdu tant qu’il reste quelque chose à trouver
Pierre Dac

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse:

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Jean-Luc Vilotte et au Professeur François Erard de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.
Merci à Mme. Stéphanie Lerondel, d'avoir accepté de prendre connaissance de mon travail et de le juger en tant qu'examinatrice, Professeur Fabrice Lalloué, je vous remercie d'avoir accepté d'être le président de ce jury.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements au Professeur Véronique Blanquet et au Docteur Laëtitia Magnol pour m'avoir choisi et accueilli au sein de leur équipe, pour avoir dirigé mes travaux et pour m'avoir encadré durant ces trois années.

Je remercie également Alexis Parenté pour son aide indispensable dans l'analyse phénotypique des souris et pour la relecture assidue de ce manuscrit.

Je remercie Fabienne Baraige pour tous ces muscles découpés, marqués et photographiés, Karine Vuillier-Devillers pour la mesure des activités enzymatiques, Lionel Forestier pour son expertise de la PCRq, Karine Pasquier pour avoir pris soin de toutes ces petites souris.

Je remercie l'ensemble des membres de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale, et notamment ceux avec qui j'ai pu échanger tout au long de ma thèse et partager des moments de détente.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma gratitude envers mes parents, mon frère et mes soeurs qui m'ont soutenu durant toutes ces années et qui m'ont encouragé dans cette voie.

Communications

Publication

Alexis Parenté, Victor Gondran-Tellier, Axel Boukredine, Fabienne Baraige, Karine Vuillier-Devillers, Bruno Passet, Jean-luc Vilotte, Laetitia Magnol and Véronique Blanquet. Molecular and phenotypic characterization of a mouse model overexpressing *Gasp-2*, en préparation.

Communications écrites

2014 Victor Gondran-Tellier, Luce Pèrié, Véronique Blanquet, Laetitia Magnol. Molecular mechanisms involved in the control of muscle mass: roles of GASP/WFIKKN proteins. 17ème séminaire des thésards – Département de Génétique Animale – INRA, Jouy-en-Josas, France

2015 Victor Gondran-Tellier, Véronique Blanquet, Laetitia Magnol. Molecular control of muscle mass: roles of the proteins GASP/WFIKKN. Séminaire de l'Institut GEIST-Septembre 2015-Limoges

2016 Victor Gondran-Tellier, Luce Pèrié, Alexis Parenté, Véronique Blanquet, Laetitia Magnol. Molecular control of muscle mass: roles of the proteins GASP/WFIKKN, two Myostatin antagonists. 5TH International Congress of myology, Lyon, France

Communication orale

2015 Victor Gondran-Tellier, Véronique Blanquet, Laetitia Magnol. Molecular control of muscle mass: *in silico* and *in vivo* study of the proteins GASP/WFIKKN. 18ème séminaire des thésards – Département de Génétique Animale – INRA, La Rochelle, France

Abréviations

ActRIIa/IIb :	Activin Receptor type-IIa/IIb	Akt :	Protein kinase B
ALK :	Activin-like kinase	BMP :	Bone Morphogenetic Protein
BPTI :	Bovine pancreatic trypsin inhibitor	*CCR5* :	Chemokine (C-C motif) receptor 5
CMV :	CytoMégaloVirus	DAG :	Directed Acyclic Graphs
DAPI :	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole	Dffa :	DNA fragmentation factor, alpha subunit
EDL :	*Extensor digitorum longus*	EGF :	Epidermal Growth Factor
Emcn :	Endomucin	ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinase
FABP :	Fatty acid bindin protein	FDC :	Four-disulfide core
FLRG / FSTL3 :	Follistatin related-gene / Follistatin-like 3	FS / FST :	Follistatine
GAPDH :	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GASP :	GDF-Associated Serum Protein
GDF :	Growth and Differentiation Factor	GO :	Gene ontology
HE4 / WFDC2:	Human Epididymal Protein 4 / WAP four-disulfide core domain 2		
IgC2 :	Immunoglobulin C-2	IGF :	Insulin-like Growth Factor
IGF-R :	Insulin-like Growth Factor-Receptor	KAL1 :	Kallmann syndrome 1
KSPI :	Kazal-type serine protease inhibitor		
MAGP-2 / Mfap5 :	Microfibril-associated glycoprotein 2 / microfibrillar associated protein 5		
MLC :	Myosin Light Chain	Mmp :	Matrix MetalloProteinase
MSTN :	Myostatine	MyHC :	Myosin Heavy Chain
MYL :	Myosin, light	NTR :	Nétrine
NWM :	New world monkey		
PAI1 / Serpine1 :	Phosphoribosylanthranilate isomerase / serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1		
PCOLCE :	Procollagen C-endopeptidase enhancer protein		
PCOS :	polycystic ovary syndrome	SLPI :	Secretory leucocyte protease inhibitor
Smad :	Sma Mothers Against Decapentaplegic homolog		
TA :	*tibialis anterior*	TGF :	Transforming Growth Factor
TIMP :	Tissue inhibitor of metalloproteases	TLD :	Tolloid
uPA :	Urokinase	WAP :	Whey acidic protein
WFIKKN :	WAP, Follistatin, Kazal, Immunoglobulin, Kunitz, Kunitz, Netrin-containing protein		
Wnt :	Wingless-type MMTV integration site family member		

Table des matières

Introduction générale **1**

Exposé bibliographique **4**

1. Les protéines WFIKKN/GASP : une double découverte **5**

1.1. La découverte des protéines WFIKKN par leur domaine NTR **5**

1.2. La découverte des protéines GASP par leur interaction avec la myostatine **6**

2. Caractéristiques des gènes *Gasp* et des protéines GASP chez la souris **7**

2.1. Structure des gènes *Gasp* murins 7

2.2. Les différents domaines des protéines GASP 7

2.2.1. Le domaine WAP 7

2.2.2. Le domaine Folistatine/Kazal 9

2.2.3. Le domaine IgC2 10

2.2.4. Les deux domaines Kunitz 10

2.2.5. Le domaine NTR 11

2.3. Modifications post-traductionelles des protéines GASP 13

2.4. Le profil d'expression des transcrits *Gasp* et protéines GASP 14

2.5. Évolution des protéines GASP 15

2.6. Étude des fonctions des protéines GASP par des approches *in vitro* 17

2.6.1. Rôle putatif des protéines GASP par des approches *in vitro* 17

2.6.2. Rôle des protéines GASP dans l'inhibition de la myostatine et GDF11 19

3. Contribution des modèles animaux pour l'étude des fonctions des protéines GASP **27**

3.1. Phénotype musculaire des modèles de sous- ou sur-expression des protéines GASP 27

3.2. Syndrome métabolique 34

3.3. Phénotype squelettique dans des modèles de sous-expression des protéines GASP 34

3.4. Différences entre les modèle de souris KO pour la myostatine et de souris TgGasp-1 35

Projet de thèse **37**

1. Étude *in vivo* de la protéine GASP-2 ..... **38**

2. Analyses des données transcriptomiques dans un contexte de sur-expression de GASP-1 ..... **38**

Matériels et méthodes **39**

1. Matériels biologiques **40**

1.1. Lignées murines et cellulaires 40

1.2. Plasmide : pcDNA3.1-V5/His 40

1.3. Souche bactérienne 40

1.4. Anticorps 41

2. Biologie Moléculaire **41**

2.1. Extraction d'ADN/ARN - PCR 41

2.1.1. Extraction d'ADN génomique à partir de queue de souris / tissus 42

2.1.2. Extraction d'ADN génomique à partir de sang 42

2.1.3. Extraction d'ADN plasmidique 42

2.1.4. Extraction d'ARN 42

2.1.5. Contrôle qualité des ARN 43

2.1.6. Rétrotranscription 43

2.1.7. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) 43

2.2. Ligature en vecteur TOPO® 43

2.3. Transformation 44

2.4. Réaction de séquençage 44

2.5. Purification de séquence 44

2.6. PCR quantitative en temps réel 45

2.6.1. Méthodologie SybrGreen 45

2.6.2. PCR quantitative Taqman 48

2.7. Test ELISA 48

2.8. Mesure des activités enzymatiques du muscle squelettique par spectrophotométrie 50
2.9. Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle 51
2.9.1. Extraction des protéines totales 52
2.9.2. Première dimension : Isoelectrofocalisation 52
2.9.3. Deuxième dimension : SDS-PAGE 53
2.9.4. Coloration des gels au bleu colloïdal 54
2.9.5. Analyse information des cartes protéiques 54
2.9.6. Digestion des protéines 54
2.9.7. Analyse par spectrométrie de masse 55
2.9.8. Recherche dans les bases de données 55
2.10. Western Blot 56
3. Suivi poids/taille 57
4. Prélèvements d'échantillons biologiques 57
4.1. Prélèvement de sang sur animaux anesthésiés 57
4.2. Nécropsie 57
5. Histologie 57
5.1. Inclusion paraffine 57
5.2. Inclusion OCT 58
5.3. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran 59
5.4. Immunomarquage anti-laminine 59
5.5. Immunomarquage – typage des chaines lourdes de myosine 60
5.6. Observation et acquisition des images 60
5.7. Analyse des images 61
6. Analyse *in silico* 61
6.1. Traitement des données brutes 61
6.2. Analyse des données 62

Résultats 66
1. Étude *in vivo* du rôle de la protéine GASP-2 67
1.1. Création d'un modèle de souris sur-exprimmant GASP-2 67
1.1.1. Construction du vecteur de sur-expresion psurgasp-2 67
1.1.2. Génération des lignées TgGasp-2 68
1.1.3. Stabilisation des lignées TgGasp-2 72
1.2. Choix du modèle murin de sur-expression 72
1.2.1. Quantification du nombre de copies de transgène 73
1.2.2. Mesure de l'expression de *Gasp-2* dans chaque lignée TgGasp-2 75
1.2.3. Etude de la quantité des protéines GASP-2 dans le sang 75
1.2.4. Généalogies 77
1.3. Caractérisation phénotypique 79
1.3.1. Courbes de croissance 79
1.3.2. Caractérisation du phénotype musculaire 79
1.3.3. Variation phénotypique du tissu adipeux 91
2. Étude *in silico* du rôle de la protéine GASP-1 93
2.1. Analyse transcriptomique des cellules primaires en différenciation 93
2.2 Identification des protéines différentiellement exprimées (TgGasp-1.20 vs FVB) 97

Discussion 101
1. Caractérisation phénotypique de la lignée TgGasp-2 102
2. Analyses « -omiques » dans un contexte de sur-expression de *Gasp-1* 107

Références 112

Annexes 120

Listes des figures

Figure 1 : Architecture modulaire des protéines WFIKKN 5
Figure 2 : Structure des gènes *Gasp* et protéines GASP chez la souris 8
Figure 3 : Architecture de deux isoformes de la follistatine 10
Figure 4 : Les protéines à domaine Follistatine 10
Figure 5 : Architecture modulaire des protéines portant le domaine NTR 11
Figure 6 : Structure du module NTR de PCOLCE1 12
Figure 7 : Profil d'expression des transcrits *Gasp* et protéines GASP 14
Figure 8 : Évolution des protéines GASP 16
Figure 9 : Changements osseux associés à la perte de la myostatine chez la souris 20
Figure 10 : Biosynthèse et processus protéolytique de GDF11 et la myostatine 22
Figure 11 : GDF11 exerce de nombreuses fonctions durant le développement embryonnaire 23
Figure 12: GDF11 exerce de nombreuses fonctions chez l'adulte 24
Figure 13 : Les deux modes de liaison des protéines GASP à la myostatine 25
Figure 14 : Phénotypes observés associés à une mutation invalidant la myostatine ou sur-exprimant un de ses inhibiteurs 33
Figure 15 : Différences entre la qPCR SybrGreen et la qPCR Taqman 49
Figure 16 : Les réactions catalysées par les enzymes LDH et ICDH 50
Figure 17: Gradient de voltage au cours de l'étape d'IEF 53
Figure 18 : Architecture de la plateforme WebGestalt 63
Figure 19: Graphiques acycliques dirigés 64
Figure 20 : Séquence de l'ADNc de *Gasp-2* insérée dans le vecteur de sur-expression 68
Figure 21 : Représentation du vecteur utilisé pour cloner le transgène CMV*Gasp-2* 69
Figure 22 : Les différentes étapes de la transgenèse aléatoire 70
Figure 23 : Expression relative de *Gasp-2* dans les lignées TgGasp-2 76
Figure 24 : Expression relative de la protéine GASP-2 dans le sérum des lignées TgGasp-2 77
Figure 25 : Courbe de croissance des souris TgGasp-2 et sauvages 79
Figure 26 : Evaluation de la masse totale des souris 80
Figure 27 : Evaluation de la masse de différents muscles dans les lignées TgGasp-2 (analyse normalisée) 81
Figure 28 : Evaluation de la masse de différents muscles dans les lignées TgGasp-2 (analyse non normalisée) 83
Figure 29 : Coupes histologiques de différents muscles de souris TgGasp-2 et sauvages 84
Figure 30 : Aire moyenne des fibres musculaires 86
Figure 31 : Distribution de l'aire des fibres musculaires 87
Figure 32 : Comptage manuel du nombre de fibres du soleus 89
Figure 33 : Mesure de l'activité enzymatique musculaire 91
Figure 34 : Estimation de la masse du tissu adipeux 92
Figure 35 : Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés selon le stade de différenciation 93
Figure 36 : Photographies de deux gels bidimensionnels réalisé à partir d'extraits protéiques issues de quadriceps prélevés chez les lignées TgGasp-1.20 et FVB 98
Figure 37 : Expression de GRP78 100
Figure 38 : Position des mutations non synonymes trouvées chez les singes NWM 106

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents domaines des protéines GASP 13
Tableau 2: Phénotype musculaire des souris TgGasp-1 et des souris Gasp-1-/- ou Gasp-2-/-…… ... 32
Tableau 3 : liste des anticorps utilisés 41
Tableau 4 : Les différentes amorces utilisées..... 47
Tableau 5 : Composition du tampon de réhydratation des bandes d'IPG..... 52
Tableau 6 : Composition du gel de polyacrylamide..... 53
Tableau 7 : Protocole d'inclusion en paraffine et protocole de coloration HES 58
Tableau 8 : Les différents fluorochrome utilisés..... 60
Tableau 9 : Gènes inclus dans une catégorie de GO 65
Tableau 10 : Analyse de la descendance 71
Tableau 11 : Exemple de résultats obtenus pour l'estimation du nombre de copies du transgène dans les lignées TgGasp-2 74
Tableau 12 : Efficacité des croisements des lignées TgGasp-2 78
Tableau 13 : Aire moyenne des fibres musculaires par individu et par muscle 85
Tableau 14 : Nombre de fibres musculaires par muscle..... 89
Tableau 15 : Composition des muscles selon le type de fibres musculaires 90
Tableau 16: Les processus biologiques les plus affectés par la sur-expression de GASP-1 durant la différenciation des myoblastes primaires S20..... 94
Tableau 17 : Ratio de sous- et sur-expression des onze gènes sélectionnés 95
Tableau 18 : Liste des amorces SybrGreen présentant une efficacité suffisante 96
Tableau 19 : Les principales protéines dont l'expression varie entre des souris, âgées de 3 ou 12 semaines, des lignées TgGasp-1.20 et FVB au niveau du quadriceps 100
Tableau 20 : Expression et localisation de plusieurs isoformes de la myosine..... 108

Introduction générale

Le muscle squelettique représente près de la moitié de la masse du corps et joue un rôle indispensable dans la locomotion des êtres vivants. C'est aussi un organe endocrine qui sécrète de nombreuses cytokines. La myostatine, membre de la superfamille des TGFβs, est une cytokine musculaire et un des inhibiteurs majeurs de la myogenèse. A l'heure actuelle, la myostatine est au centre de nombreuses stratégies thérapeutiques notamment dans le cadre de thérapies visant à améliorer la fonction musculaire (atrophie, myopathies). En effet, il a été montré qu'une inhibition de cette voie entraine une augmentation de la masse musculaire chez les mammifères. Son invalidation chez la souris (le modèle murin Mstn-/-) entraîne une hyperplasie (augmentation du nombre) et une hypertrophie (augmentation de l'aire) des myofibres ainsi que d'une augmentation du nombre de fibres glycolytiques dites rapides.
Dès lors, de nombreuses études sont mises en place pour inhiber l'action de la myostatine, que ce soit par l'utilisation d'anticorps neutralisants, par ciblage direct du gène, ou encore par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. Parmi ces derniers, les inhibiteurs les plus connus de la myostatine sont la follistatine, FSTL3 et les protéines GASP-1 et GASP-2. Les protéines GASP se présentent alors comme de véritables cibles thérapeutiques nécessitant une maîtrise parfaite de leur fonction dans l'organisme entier.

C'est dans ce contexte, que s'inscrivent les travaux de l'équipe de Véronique Blanquet au sein du laboratoire de Génétique Moléculaire Animale à Limoges, avec un intérêt particulier pour l'étude de la voie de signalisation de la myostatine et ses inhibiteurs GASP-1 et GASP-2. L'analyse fonctionnelle de ces protéines est réalisée à la fois *in vitro* sur des cellules musculaires, mais également *in vivo* à l'aide de modèles murins, afin de déterminer les fonctions des protéines GASP à la fois dans un contexte myogénique mais également à une échelle plus globale. Dans un premier temps, l'équipe a généré une lignée de souris transgéniques sur-exprimant le gène *Gasp-1*, la lignée TgGasp-1.20. Cette lignée présente une augmentation globale du poids des muscles squelettiques et une hypertrophie, conséquences d'une inhibition de la myostatine. Cependant, contrairement aux souris knock-out pour la myostatine, cette lignée ne présente ni d'hyperplasie, ni de changement dans la proportion des différents types de fibres musculaires, ni de variation de métabolisme.

Au commencement de ma thèse en 2013, la création de différentes lignées de souris transgéniques sur-exprimant de manière ubiquitaire le gène Gasp-2 a été entreprise. Je participe alors à la génération de quatre lignées transgéniques TgGasp-2. L'analyse phénotypique de ce modèle murin montre à 12 semaines, une augmentation globale du poids des souris et de certains muscles squelettiques. Une hypertrophie des fibres musculaires sur les trois muscles étudiés a pu

être mise en évidence. Comme pour les souris TgGasp-1, à la différence des souris Mstn-/-, le nombre total de fibres des souris TgGasp-2 et leur métabolisme ne présentent pas de variation par rapport aux souris sauvages. L'ensemble des analyses réalisées nous laisse alors supposer que la surexpression de *Gasp-2* dans nos lignées transgéniques n'a pas d'effet sur le développement musculaire prénatal, lieu de la détermination du nombre de fibres. L'analyse phénotypique met aussi en évidence un switch du type de fibres dans les souris TgGasp-2.

Les protéines GASP font partie d'un réseau génique incluant la myostatine mais également un ensemble de protéines participant aux voies de signalisation des TGFβ. Si la protéine GASP-1, de par son action antagoniste sur la myostatine, présente un intérêt, il convient d'étudier plus en détail l'action de sa surexpression sur l'interactome dans lequel elle participe. Pour cela, le laboratoire a réalisé une étude transcriptomique sur des cellules musculaires primaires sur-exprimant ou non GASP-1 et une étude protéomique à partir du quadriceps de souris sur-exprimant ou non GASP-1. Mon travail a alors consisté à analyser les données d'expressions obtenues à l'issue de ces analyses pour identifier les cascades myoblastiques régulées par GASP-1 lors de la différenciation myoblastique. Dans un premier temps, j'ai recherché l'ensemble des gènes présentant une modification de leur expression dans les cellules sur-exprimant *Gasp-1* : plus de 3000 gènes ont été sélectionnés. Par la suite, j'ai identifié les processus biologiques sur-représentés. Il s'agit des processus musculaires, angiogéniques, de régénération, d'adhésion, du cytosquelette et du cycle cellulaire. En effet, une grande partie des gènes impliqués dans ces processus appartenaient également à la liste des 3000 gènes sous- ou sur-exprimés. 600 gènes impliqués dans ces processus biologiques ont ainsi été sélectionnés. Une étude bibliographique m'a permis de sélectionner 11 gènes pour de futures analyses, tels que *Cd36, Mfap5*, *Myh4*, *Myh7*, *Myh2*, *Myh1*, *Fabp4*, *Fabp3*, *Serpine1*, *Emcn* et *Mmp2*. Cette analyse devrait fournir une meilleure compréhension du rôle de GASP-1 dans la myogenèse.

L'ensemble de ces résultats sera présenté dans la deuxième partie de mon manuscrit sous forme de deux parties commentées après l'exposé bibliographique. Enfin, la dernière partie de mon manuscrit de thèse sera consacrée à une discussion sur l'implication de GASP-1, GASP-2 et de la myostatine dans les contextes musculaires.

Exposé bibliographique

La famille des protéines WFIKKN/GASP est composée de deux protéines sécrétées à multidomaines : WFIKKN1/GASP-2 et WFIKKN2/GASP-1. Les protéines WFIKKN/GASP exercent des fonctions dans les tissus musculaires et squelettiques via l'inhibition de certains membres de la super-famille des Transforming Growth Factor Beta (TGFβ) comme la myostatine (MSTN/GDF8) et GDF11/BMP11. Cependant, bien que leurs domaines d'expression soient plus larges, les rôles des protéines WFIKKN/GASP dans les autres tissus sont peu étudiés.

1. Les protéines WFIKKN/GASP : une double découverte

1.1. La découverte des protéines WFIKKN par leur domaine NTR

Le domaine NTR (voir le chapitre 2.2.5 Le domaine NTR) des protéines TIMP et PCOLCE ayant été montré comme impliqué dans l'inhibition des métalloprotéases ou pouvant l'être dans le cas des nétrines (Bányai et Patthy, 1999 ; Mott *et al*., 2000 ; Galko et Tessier-Lavigne, 2000), l'équipe de Patthy a cherché en 2001 à identifier de nouvelles protéines contenant un domaine NTR et étant associées à l'inhibition des métalloprotéases (Trexler *et al*., 2001). Ainsi, ils ont identifié un gène humain, localisé sur le chromosome 16, composé de deux exons et un intron et qui code WFIKKN, une protéine sécrétée comprenant plusieurs domaines : WAP, Follistatine/Kazal, IgC2, deux Kunitz en tandem, NTR (***figure* 1**). Le premier exon (environ 570 pb) code un peptide signal pour la sécrétion et le domaine WAP (Whey Acidic Protein), alors que l'exon le plus large code le domaine Follistatine/Kazal, le domaine IgC2 (Immunoglobulin C2 type), deux domaines Kunitz en tandem et un domaine NTR.

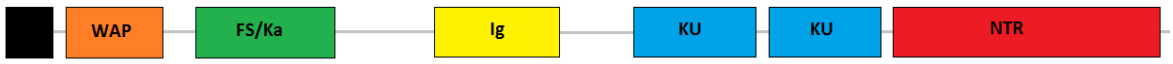


Figure 1 : Architecture modulaire des protéines WFIKKN

La protéine WFIKKN est constituée en plus du domaine NTR, d'un domaine WAP, d'un domaine Follistatine/Kazal, d'un domaine immunoglobuline et de deux domaines Kunitz en tandem. Le rectangle noir correspond au peptide signal, le rectangle orange correspond au domaine WAP, le rectangle vert correspond au domaine Follistatine/Kazal, le rectangle jaune correspond au domaine immunoglobuline, les rectangles bleus correspondent aux deux domaines Kunitz et le rectangle rouge correspond au domaine NTR.
(D'après Trexler et al., 2001).

Certains de ces domaines (WAP, Kunitz et Kazal) sont fréquemment impliqués dans l'inhibition de diverses protéases alors que le domaine NTR est impliqué dans l'inhibition des métalloprotéases. Ceci suggère que WFIKKN peut être une protéine à multi-domaines inhibitrice de protéases et de métalloprotéases. Ainsi, il a été montré que le second domaine Kunitz de WFIKKN est capable d'inhiber la trypsine (Nagy *et al*., 2003).

En 2002, la même équipe a identifié un gène homologue à WFIKKN, localisé sur le chromosome 17, composé également de deux exons et d'un intron et appelé WFIKKNRP (Trexler *et al*., 2002).

1.2. La découverte des protéines GASP par leur interaction avec la myostatine

La myostatine, un membre de la super-famille des TGFβ est un puissant régulateur négatif de la croissance des muscles squelettiques (McPherron *et al*., 1997). Dans le sérum, la myostatine circule en partie sous la forme d'un complexe latent contenant le propeptide de la myostatine, FSTL3/FLRG, et/ou la follistatine notamment (Hill *et al*., 2002 ; Cash *et al*., 2012 ; Cash *et al*., 2009). De par les potentiels enjeux thérapeutiques que représente la myostatine, celle-ci fait l'objet d'études intensives. Les modes de régulation de la voie de signalisation de la myostatine sont loin d'être totalement élucidés. En 2003, pour approfondir les connaissances sur ces mécanismes moléculaires, Hill *et al*. ont recherché des partenaires de liaison à la myostatine dans le sérum chez l'homme et la souris. Dans cette optique, la myostatine a été isolée à partir d'échantillons de sérum de ces deux espèces. Une analyse par spectrométrie de masse des protéines qui co-immunoprécipitent avec la myostatine leur a permis d'identifier une protéine, appelée Growth and differentiation factor-Associated Serum Protein-1 (GASP-1) (Hill *et al*., 2003). Dans la même étude, une protéine ayant 55% d'identité de séquence protéique avec GASP-1 a également été mise en évidence et dénommée GASP-2. Si GASP-1 et GASP-2 peuvent inhiber la myostatine, elles sont par contre incapables d'inhiber l'activine (Hill *et al*., 2003 ; Kondás *et al*., 2008). Cela les différencie d'un autre inhibiteur de la myostatine, la follistatine qui comme les protéines GASP possède un domaine Follistatine/Kazal mais est capable d'inhiber la myostatine et l'activine (voir le chapitre 2.2.2 Le domaine Follistatine/Kazal).

Finalement, il a été montré que GASP-1 et GASP-2 sont des homologues murins des deux protéines humaines WFIKKNRP et WFIKKN renommées par la suite WFIKKN-2 et WFIKKN-1 (Liepinsh *et al*., 2006). Dans cette étude, seul GASP-1 et son homologue WFIKKN-2 ont été retrouvées comme pouvant se lier à la myostatine, contrairement à GASP-2 et son homologue

WFIKKN-1. WFIKKN-1/GASP-2 et WFIKKN-2/GASP-1 partagent 55% d'identité de séquence entre elles tandis que les différents orthologues sont très similaires.

2. Caractéristiques des gènes *Gasp* et des protéines GASP chez la souris

2.1. Structure des gènes *Gasp* murins

Le gène murin codant GASP-1 est localisé sur le chromosome 11 et comporte deux exons (353 pb et 3163 pb) et un intron (3236 pb). Le transcrit de 3516 pb est constitué d'une séquence codante de 1716 bases qui code une protéine de 571 acides aminés et d'une masse moléculaire prédite de 63 kDa (***figure 2A***).

Le gène murin codant GASP-2 est situé sur le chromosome 17 et comporte deux exons (442 pb et 1539 pb) et un intron (695 pb). Le transcrit de 1981 pb est constitué d'une séquence codante de 1659 bases qui code une protéine de 552 acides aminés et d'une masse moléculaire prédite de 60 kDa (***figure 2B***).

2.2. Les différents domaines des protéines GASP

La structure même des protéines GASP, avec 5 domaines protéiques différents, en fait des protéines particulières et uniques avec certains de ces domaines pouvant être impliqués dans l'inhibition de diverses protéases et métalloprotéases.

2.2.1. Le domaine WAP

Le terme FDC (four-disulfide core) a été utilisé à l'origine pour décrire un domaine structural partagé entre un groupe de petites protéines riches en ponts disulfures (Drenth *et al*., 1980 ; Bingle, 2011). Ce domaine contient environ 40 à 50 acides aminés incluant huit résidus cystéines conservés qui génèrent quatre ponts disulfures. Les membres de la famille de protéines contenant le domaine WAP/FDC sont également appelés les protéines WFDC (whey/four-disulfide core) (Ranganathan *et al*., 1999) car la protéine WAP (whey acidic protein), protéine majeure du petit-lait du lait de souris, contient également ce domaine (Hennighausen et Sippel, 1982). Chez l'homme, la majorité des protéines contenant le domaine WAP est codée par des gènes présents sur le locus WFDC localisé sur le chromosome 20 (Clauss *et al*., 2002). En dehors de ce locus, se trouvent quatre gènes additionnels codant des protéines avec un domaine WAP : *Gasp-1*, *Gasp-2*, *Kal1* et *Wfdc1* (Trexler *et al*., 2001 ; Trexler *et al*., 2002 ; del Castillo *et al*., 1992 ; Larsen *et al*., 1998). Certaines protéines possédant un domaine WAP/WFDC sont

connues comme étant des inhibitrices de protéases (***tableau 1***). En effet, il existe plusieurs types d'inhibiteurs de sérines protéases qui varient en spécificité et en capacité inhibitrice.

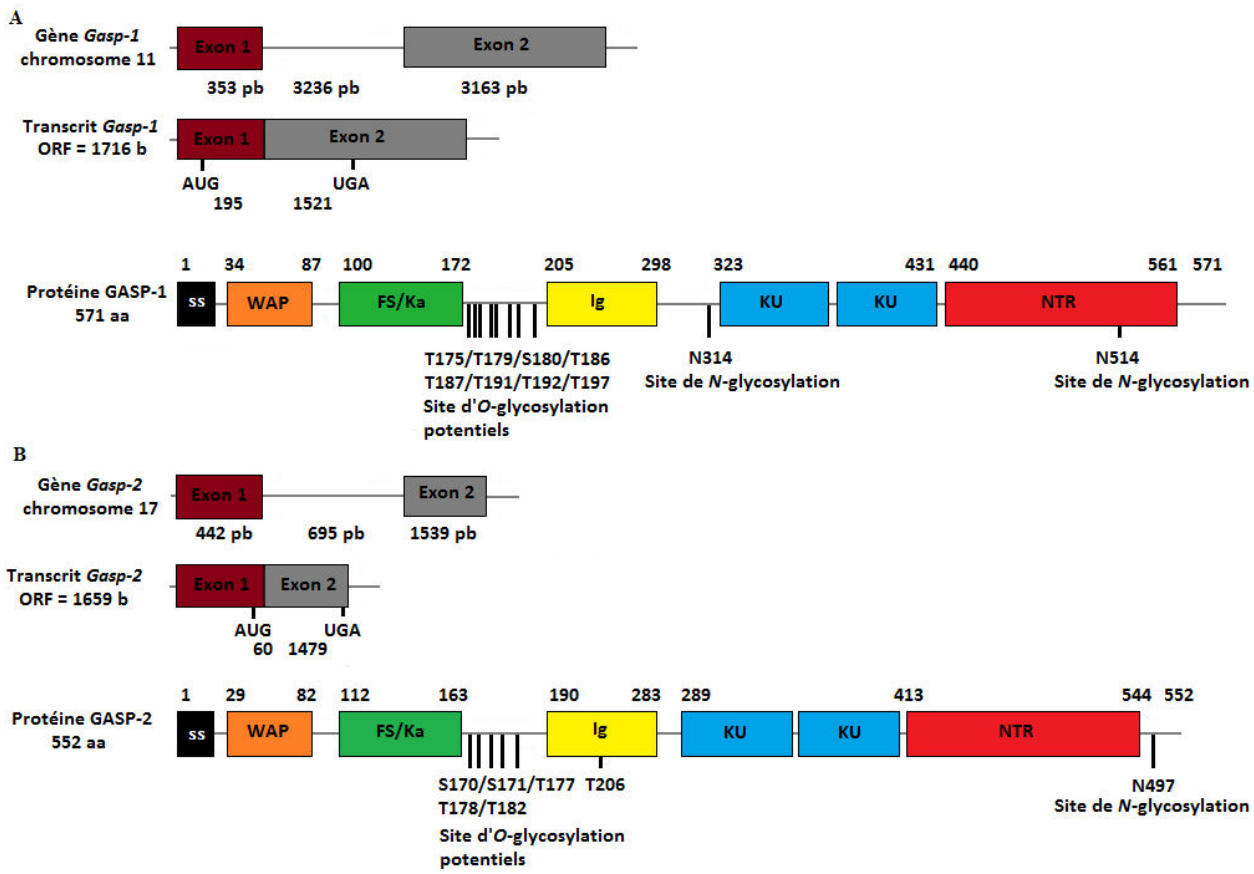


Figure 2 : Structure des gènes *Gasp* et protéines GASP chez la souris

(A) *Le gène Gasp-1 a deux exons aboutissant à un transcrit de 1716 bases qui code une protéine de 63,3 kDa correspondant à une chaîne de 571 acides aminés. La protéine GASP-1 a une séquence de sécrétion (ss) de 29 acides aminés et contient un domaine WAP, un domaine Follistatine (F) incluant un motif Kazal (K), deux domaines Kunitz et un domaine NTR.* ***(B)*** *Le gène Gasp-2 a deux exons aboutissant à un transcrit de 1659 bases et code une protéine de 59,8 kDa soit une chaîne de 552 acides aminés. La protéine GASP-2 a une séquence de sécrétion (ss) de 25 acides aminés et présente la même architecture en domaine que GASP-1.*

Sur ce schéma, les sites de N-glycosylation et d'O-glycosylation des protéines GASP sont également représentés. Les sites de N-glycosylation ont été identifiés expérimentalement chez la souris alors que les sites d'O-glycosylation n'ont été identifiés que par analyse in silico. Ces sites sont cependant conservés chez les vertébrés.

Le rectangle marron correspond à l'exon 1 des gènes et transcrits Gasp, le rectangle gris correspond à l'exon 2 des gènes et transcrits Gasp, le rectangle noir correspond à la séquence de sécrétion, le rectangle orange correspond au domaine WAP, le rectangle vert correspond au domaine Follistatine/Kazal, le rectangle jaune correspond au domaine immunoglobuline, les rectangles bleus correspondent aux deux domaines Kunitz et le rectangle rouge correspond au domaine NTR.

(D'après Brun et al., 2012, Pèrié et al., 2016).

Les serpines, les inhibiteurs de type α-1-protéase et l'antithrombine III, sont des inhibiteurs efficaces, qui suivant une attaque protéolytique, se lient covalemment à la serine protéase cible et défont la structure protéique au niveau du site catalytique (Huntington *et al*., 2000). D'autres inhibiteurs, comme les inhibiteurs de type Kunitz et Kazal, se lient au niveau du site catalytique de l'enzyme cible, empêchant l'accès au substrat (Rühlmann *et al*., 1973 ; Bolognesi *et al*., 1982). Le même mécanisme est exercé par les inhibiteurs de type WFDC qui sont composés uniquement du domaine WAP/WFDC. En effet, dans ce cas, les résidus du domaine forment une structure relativement plate, avec la chaîne peptidique repliée en deux brins β centraux entourés par deux brins peptidiques qui se rejoignent à une extrémité de la molécule, formant une structure en boucle qui se lie au site actif des sérines protéases pour les inhiber (Clauss *et al*., 2005 ; Grütter *et al*., 1988 ; Tsunemi *et al*., 1996). Les protéines WAP/WFDC humaines les plus étudiées sont la SLPI (secretory leucocyte protease inhibitor) et l'élafine qui sont des inhibiteurs puissants de l'élastase des leucocytes (Wiedow *et al*., 1990 ; Thompson et Ohlsson, 1986 ; Scott *et al*., 2011). D'autres protéines possédant le domaine WAP comme l'eppine ou HE4/WFDC2 peuvent fonctionner comme des inhibiteurs de protéases (Richardson *et al*., 2001 ; Hua *et al*., 2014).

2.2.2. Le domaine Follistatine/Kazal

La follistatine joue un rôle important de médiateur du développement cellulaire et de la différenciation dans un certain nombre de tissus et d'organes (Welt *et al*., 2002 ; Michel *et al*., 1993 ; DePaolo, 1997). Après le peptide signal et les 63 résidus de la partie N-terminale de la follistatine, la majorité de la follistatine (résidus 64 à 288) est composée de trois domaines successifs de 73 à 75 résidus de long. Chacun de ces trois domaines, appelé domaine Follistatine/Kazal est constitué de répétitions de dix cystéines et partage 50% d'identité de séquence avec les deux autres (Keutmann *et al*., 2004 ; ***figure 3***). Le sous-domaine N-terminal de la follistatine a des similarités avec les modules de type EGF, alors que la région C-terminale ressemble au domaine Kazal qui est retrouvé dans de multiples inhibiteurs de sérines protéases (Krowarsch *et al*., 2003 ; ***tableau 1***). En effet, les protéines KSPI (Kazal-type serine protease inhibitor) constituent une large famille d'inhibiteurs de protéases et possèdent un ou plusieurs domaines Kazal (Laskowski et Kato, 1980). Le domaine Follistatine/Kazal est principalement responsable de la fixation des protéines GASP avec le dimère mature de la myostatine (Kondás *et al*., 2008). La follistatine ainsi que les protéines GASP font partie des protéines à domaine Follistatine. Parmi les protéines à domaine Follistatine, les protéines GASP sont à part car elles inhibent spécifiquement la myosatine et son homologue GDF11 (***figure 4***).

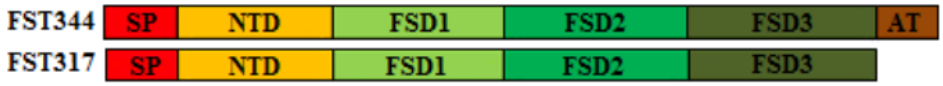


Figure 3 : Architecture de deux isoformes de la follistatine

SP : peptide signal ; NTD : domaine N-terminal ; FSD : domaine Follistatine ; AT : queue acidique.

(D'après http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/FSTID44477ch5q11.html).

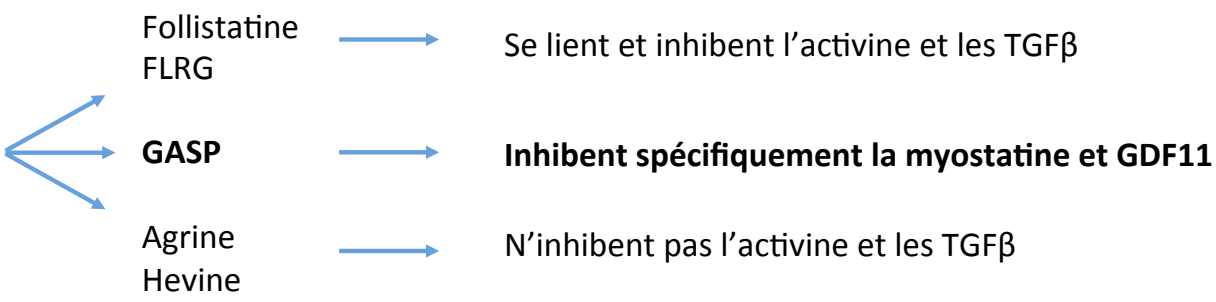


Figure 4 : Les protéines à domaine follistatine

Les protéines à domaine Follistatine peuvent être séparées en deux grandes catégories : (i) la catégorie des protéines à domaine Follistatine (Follistaune et FLRG) qui se lient et inhibent l'activine et les TGFβ et (ii) la catégorie des protéines à domaine Follistatine (Agrine, Hevine, etc...) qui n'inhibent pas l'activine et les TGFβ (Bányai et al., 2010 ; Brekken et al., 2004). Les protéines GASP sont à part car elles inhibent de manière spécifique la myostatine et GDF11 (Lee et Lee., 2013). Il est intéressant de noter que les protéines GASP et l'agrine peuvent se lier aux protéines BMP2, BMP4 et TGFβ1.

(D'après Bányai et al., 2010 ; Szláma et al., 2010).

2.2.3. Le domaine IgC2

Le domaine IgC2 des protéines GASP pourrait avoir une fonction structurale dans la conformation des protéines GASP (Monestier *et al*., 2012b ; ***tableau 1***).

2.2.4. Les deux domaines Kunitz

Plusieurs protéines inhibitrices de protéases de type Kunitz ont été identifiées chez les vertébrés (Shigetomi *et al*., 2010 ; ***tableau 1***). Le domaine Kunitz typique, retrouvé dans chacune des

protéines de type Kunitz, est composé de 60 acides aminés et est stabilisé par trois ponts disulfures. La protéine BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitor) est un membre classique de cette famille de protéines et a été la première inhibitrice de protéases décrite en 1936 par Kunitz et Northrop. Les inhibiteurs de type Kunitz peuvent contenir un seul domaine Kunitz ou alors le domaine peut être répété deux fois, trois fois ou plus. Le second domaine Kunitz de GASP-2 peut inhiber la trypsine quand il est isolé (Nagy *et al*., 2003).

2.2.5. Le domaine NTR

Le module nétrine (NTR) est un module d'environ 130 résidus trouvé dans la partie C-terminale des nétrines. Les nétrines sont des protéines modulaires apparentées aux laminines. Ces protéines sont composées d'un domaine homologue avec le domaine N-terminal VI de la laminine B et de trois répétitions de type EGF apparentées aux domaines V de la laminine B (Ishii *et al*., 1992).
Le domaine C-terminal des nétrines contient un domaine, appelé domaine NTR. Plusieurs études ont montré que le domaine NTR est également retrouvé dans la partie C-terminale des protéines du complément C3, C4 et C5, des protéines SFRP et des protéines PCOLCE ainsi que dans la partie N-terminale des protéines TIMP (Leyns *et al*., 1997 ; Bányai et Patthy, 1999 ; ***figure 5***).

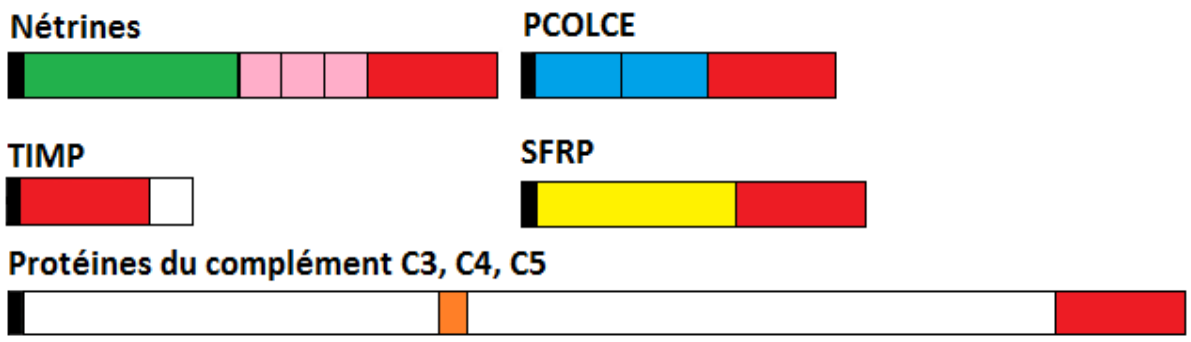


Figure 5 : Architecture modulaire des protéines portant le domaine NTR

Les protéines nétrines, PCOLCE, TIMP, SFRP, ainsi que les protéines du complément C3, C4, C5 contiennent le domaine NTR. Le rectangle jaune correspond au domaine riche en cystéine apparenté au domaine de liaison aux Wnt des récepteurs frizzled, le rectangle vert correspond au domaine homologue avec le domaine VI N-terminal de la laminine B, le rectangle rose correspond à la répétition de type EGF apparentée aux domaines V de la laminine B, le rectangle rouge correspond au domaine NTR, le rectangle orange correspond au domaine apparenté aux fibulines, le rectangle bleu correspond au domaine CUB et le rectangle noir correspond au peptide signal.
(D'après Bányai et Patthy, 1999).

Ces diverses protéines remplissent des rôles biologiques variés comme le guidage axonal, la régulation de la cascade de signalisation Wnt qui est notamment impliquée dans la maintenance de l'état indifférencié des cellules souches (Blanpain, 2007) ou le contrôle de l'activité des métalloprotéases qui sont notamment impliquées dans la biosynthèse des TGFβ (***tableau 1***). Le module NTR est un domaine basique contenant six cystéines conservées, qui sont susceptibles de former des ponts disulfures internes et contenant également plusieurs blocs conservés de résidus hydrophobes (incluant un motif YLLLG-like). Le module NTR a une structure en forme de tonneau β avec deux hélices α terminales regroupées côte à côte contre la face du tonneau β (***figure 6***).

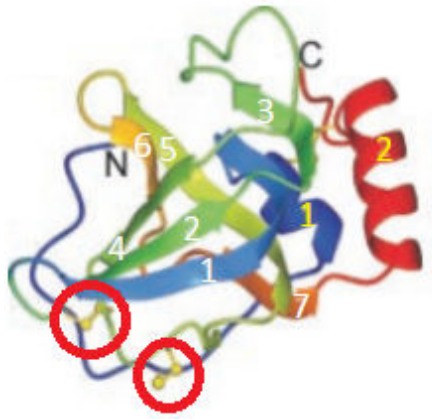


Figure 6 : Structure du module NTR de PCOLCE1

La structure du module NTR^{PCOLCE1} est une représentation en ruban.. Les ponts disulfures sont représentés sous la forme de lignes jaunes avec des sphères pour les atomes de soufre (cercles rouges). Les brins β et les hélices α sont numérotés respectivement en blanc et jaune.
(D'après Liepinsh et al., 2003).

Pour la protéine GASP-2, le domaine NTR est impliqué dans l'interaction avec le propeptide de la myostatine (Kondás *et al*., 2008), le propeptide étant produit avec la myostatine active avant d'être clivé (voir le chapitre 2.6.2.1.2 Biosynthèse de la myostatine) par la métalloprotéase BMP-1/tolloid (Wolfman *et al*., 2003). Il existe peut-être un lien entre le fait que le domaine NTR, connu comme un inhibiteur de métalloprotéases, permette la liaison de GASP-2 avec le propeptide de la myostatine et le fait que la métalloprotéase BMP-1/tolloid clive ce même

propeptide. Il est possible que le domaine NTR en plus de se fixer au propeptide de la myostatine, inhibe l'activité de la métalloprotéase BMP-1/tolloid afin d'empêcher le relargage du dimère de myostatine mature. D'ailleurs, il a été montré que le domaine NTR de la protéine PCOLCE1 joue un rôle dans la super stimulation de BMP-1/tolloid en permettant l'interaction de PCOLCE1 avec cette métalloprotéase (Bekhouche *et al.*, 2010). Dans cette idée, le domaine NTR de GASP-2 se lierait à BMP-1/tolloid mais inhiberait son activité.

	Taille	**Caractéristiques**	**Fonction associée à ce domaine**
Domaine WAP	40 à 50 aa	8 résidus cystéine formant 4 ponts disulfures	Inhibition de protéases
Domaine Follistatine/Kazal	73 à 75 aa	Répétition de 10 cystéines	Inhibition de sérines protéases Responsable de la liaison avec la myostatine
Domaine IgC2			Fonction structurale dans la conformation des protéines GASP
2 domaines Kunitz	60 aa	Stabilisés par 3 ponts disulfures	Inhibition de protéases Le 2ème domaine Kunitz de GASP-2 peut inhiber la trypsine
Domaine NTR	130 aa		Inhibition des métalloprotéases Pour GASP-2, le domaine NTR est impliqué dans l'interaction avec le propeptide de la myostatine

Tableau 1 : Les différents domaines des protéines GASP
Les différents domaines des protéines GASP sont souvent retrouvés associés à des inhibiteurs de protéases.

2.3. Modifications post-traductionelles des protéines GASP

Les protéines GASP sont des glycoprotéines, elles subissent de ce fait des modifications post-traductionnelles de type glycolytique. Il y a deux types de glycosylation, la *N*-glycosylation où des glycanes (polymères composés de monosaccharides reliés entre eux par une liaison glycosidique) sont ajoutés à une asparagine sur une séquence consensus AsnXSer/Thr et l'*O*-glycosylation où les glycanes sont ajoutés à des résidus Ser/Thr (Zhang et Wang, 2016).

Ainsi, nous avons montré au laboratoire, chez la souris, que GASP-1 est *N*-glycosylée aux résidus N314 et N514 et potentiellement *O*-glycosylée aux résidus T175, T179, S180, T186, T191, T192, S194 et T197 (***figure 2***). La perte de la *N*-glycosylation diminue la sécrétion de la protéine GASP-1, mais la capacité de GASP-1 à inhiber la myostatine n'est pas altérée (Brun *et al.*, 2012). GASP-2 est quant à elle *N*-glycosylée sur le résidu N497 et potentiellement *O*-glycosylée aux résidus S170, S171, T177, T178, T182 et T206. La perte de la glycosylation de GASP-2 n'altère pas l'inhibition de la myostatine (Pèrié *et al.*, 2016).

2.4. Le profil d'expression des transcrits *Gasp* et protéines GASP

Les protéines GASP sont des protéines principalement sécrétées dans la circulation sanguine. De plus, ces protéines sont sécrétées à partir de nombreux sites de production et pourraient agir sur des tissus où elles ne sont pas exprimées transcriptionellement (***figure 7***).

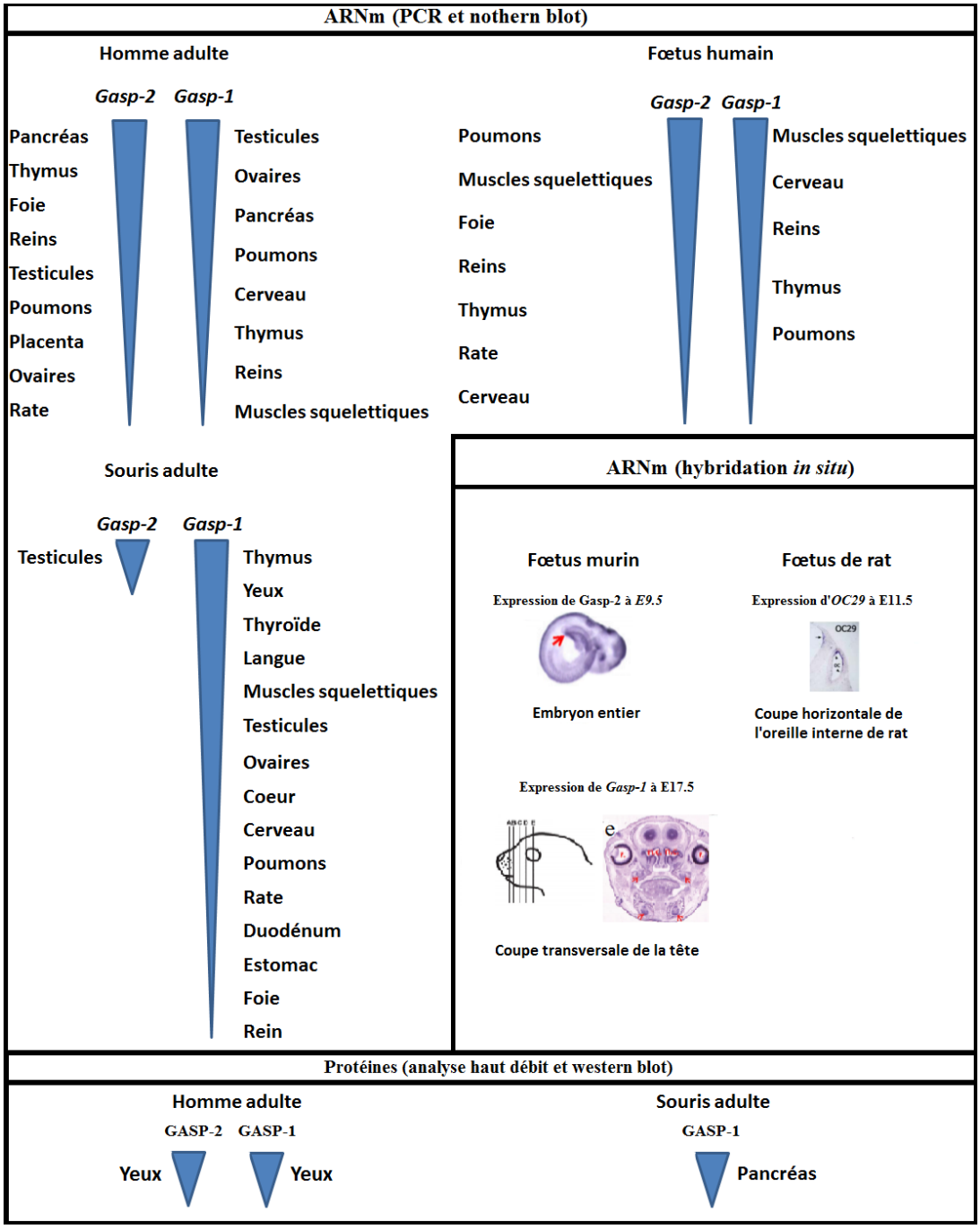


Figure 7 : Profils d'expression des transcrits *Gasp* et protéines GASP

Les gènes Gasp et protéines GASP sont exprimés de manière large dans divers organes et leurs profils d'expression varient fortement entre les gènes Gasp-1 et Gasp-2 au sein d'une même espèce et entre les différents orthologues de Gasp-1 (Gasp-1/Wfikkn-2) et Gasp-2 (Gasp-2/Wfikkn-1/Oc29). Ainsi, par exemple, chez l'homme adulte, Gasp-2 est exprimé dans le foie alors que Gasp-1 ne l'est pas (Trexler et al., 2002). Chez l'homme adulte, les gènes Gasp sont fortement exprimés dans le pancréas (Trexler et al., 2002), ce qui n'est pas le cas chez la souris adulte (Lee et Lee, 2013). Cependant, chez la souris, et malgré l'absence d'expression pancréatique, une quantité élevée de protéine GASP-1 a été observée au niveau du pancréas par western blot (Monestier et al., 2012a). Chez l'homme adulte, Gasp-1 est faiblement exprimé dans les muscles squelettiques (Trexler et al., 2002) alors que chez la souris adulte, Gasp-1 est fortement exprimé dans ce même tissu (Hill et al., 2003 ; Lee et Lee, 2013). Chez l'homme adulte, Gasp-2 est fortement exprimé dans le pancréas et en ordre décroissant dans le thymus, le foie, les reins, les testicules et les poumons (Trexler et al., 2002) alors que chez la souris adulte, Gasp-2 ne semble s'exprimer que dans les testicules (Lee et Lee, 2013). Chez l'homme, les deux protéines GASP ont été identifiées dans l'humeur aqueuse tandis que GASP-1 a été retrouvée dans les cellules du corps ciliaire des yeux (Chowdhury et al., 2010 ; Janssen et al., 2012). Chez le fœtus humain, les gènes Gasp sont fortement exprimés dans les muscles squelettiques où les protéines GASP peuvent réguler positivement la croissance musculaire en inhibant la myostatine (Trexler et al., 2002). Les données manquent en ce qui concerne l'expression des gènes Gasp dans les muscles squelettiques chez le fœtus murin. En effet, seules des expériences d'hybridation in situ ont été réalisées sur des embryons murins (Lee et Lee, 2013 ; Lee et Lee, 2015). Enfin, chez le fœtus de rat, OC29, homologue de Gasp-2, est exprimé dans l'oreille interne en développement (Nishida et al., 2004).

Le niveau d'expression des gènes Gasp et protéines GASP est représenté par un cône dont le côté large correspond à un niveau d'expression élevé, tandis que le côté le plus fin correspond à un niveau d'expression faible. Pour simplifier la lecture du schéma, seuls les organes possédant une expression de Gasp-1 et Gasp-2 avérée ont été reportés. Les organes non cités peuvent correspondre à des organes qui n'expriment ni Gasp-1 ni Gasp-2 ou des organes où leur expression n'a pas été mesurée.

(D'après Trexler et al., 2002 ; Hill et al., 2003 ; Lee et Lee, 2013 ; Monestier et al., 2012a ; Lee et Lee, 2015 ; Nishida et al., 2004 ; Chowdhury et al., 2010 ; Janssen et al., 2012).

2.5. Évolution des protéines GASP

Chez la plupart des deutérostomiens, les protéines GASP partagent la même organisation modulaire incluant les domaines WAP, Follistatine/Kazal, IgC2, Kunitz en tandem et NTR. Au contraire, l'anémone *Nematostella vectensis* appartenant aux radiés ne possède pas les gènes codant les protéines GASP. Cependant, *Nematostella vectensis* possède deux gènes qui codent la majorité des domaines retrouvés chez les protéines GASP des vertébrés. Une étude suggère que les gènes *Gasp* résultent d'une recombinaison entre les équivalents de ces deux séquences (Monestier *et al*., 2012b ; ***figure 8***).

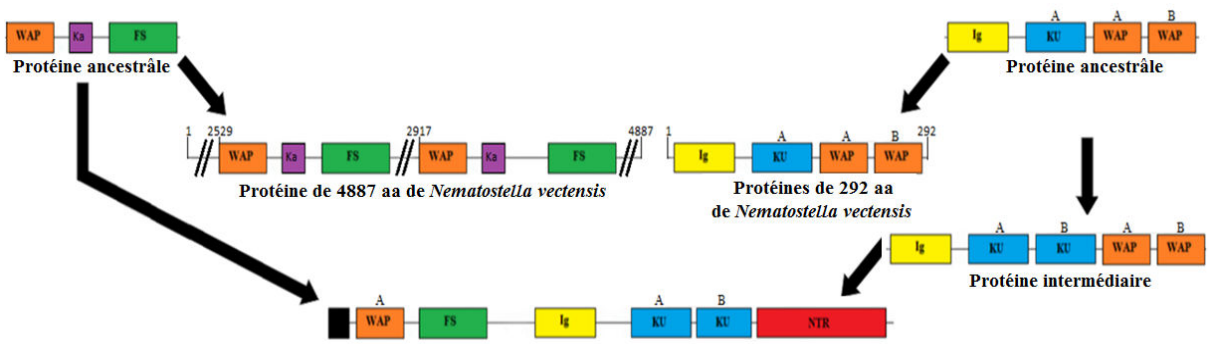


Figure 8 : Evolution des protéines GASP

À partir d'un gène codant une protéine proche de la protéine de 292 acides aminés de Nematostella vectensis, un gène codant une protéine intermédiaire s'est formé probablement par une duplication du domaine Kunitz. Les gènes Gasp se sont formés par brassage d'exons à partir de ce gène intermédiaire et d'un gène codant une protéine proche de la protéine de 4887 acides aminés de Nematostella vectensis. Les domaines WAP, Ig et Kunitz de GASP viennent du gène codant la protéine intermédiaire. Les domaines Follistatine/Kazal de GASP viennent du gène codant la protéine proche de la protéine de 4887 acides aminés de Nematostella vectensis. La structure finale de GASP a été finalement complétée par l'ajout du domaine NTR en 3' et par l'ajout du peptide signal en 5'. Le rectangle vert correspond au domaine Follistatine/Kazal, le rectangle orange correspond au domaine WAP, le rectangle bleu correspond au domaine Kunitz, le rectangle violet correspond au domaine Kazal seul, le rectangle rouge correspond au domaine NTR, le rectangle jaune correspond au domaine Immunoglobuline et le rectangle noir correspond au peptide signal.

(D'après Monestier et al., 2012b).

La même étude s'est intéressée à la conservation des séquences pour chaque module de GASP-1 et GASP-2. Comme GASP-1 est mieux conservée que GASP-2, sauf pour le domaine Ig, il est possible que cela se traduise par une meilleure relation entre GASP-1 et les protéines myostatine et GDF11. Cette différence entre GASP-1 et GASP-2 doit nécessairement se retrouver dans les fonctions contrôlées par ces protéines.

2.6. Étude des fonctions des protéines GASP par des approches *in vitro*

2.6.1. Rôle putatif des protéines GASP dans l'inhibition des sérines protéases

Les protéases sont des enzymes qui brisent les liaisons peptidiques des protéines. Les protéases et leurs inhibiteurs forment un équilibre dans l'organisme permettant de réguler de nombreux mécanismes tels que la digestion, l'homéostasie, la réponse inflammatoire, la reproduction ou encore la coagulation. Les protéases sont réparties en deux grands groupes :

- les exopeptidases qui hydrolysent la liaison peptidique aux extrémités de la chaîne polypeptidique et qui sont elles-mêmes subdivisées en aminopeptidases qui coupent entre le premier acide aminé et le second acide aminé et en carboxypeptidases qui coupent entre l'avant dernier et le dernier acide aminé.
- les endopeptidases ou protéinases qui clivent les liaisons peptidiques internes.

La plupart des peptidases clivent préférentiellement la chaîne peptidique à des positions précises, en fonction de la nature des chaînes latérales des acides aminés qui entourent le site de coupure. Dans certains cas, cette spécificité est faible, mais dans d'autres, elle peut être très sélective. La coupure peut aussi être influencée par la structure de la protéine substrat. Ainsi la chymotrypsine, enzyme digestive, coupe préférentiellement après les acides aminés aromatiques ou aliphatiques.

Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases, ce qui permet de les regrouper en grandes familles mécanistiques, en fonction de la nature des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse. Ces protéases se distinguent ainsi :

- les sérines protéases possédant une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine, une histidine et un aspartate. Le groupement hydroxyle de la sérine joue le rôle de nucléophile et attaque le carbonyle de la liaison peptidique. La trypsine du pancréas qui est spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles l'acide aminé engagé par son carboxyle est une lysine ou une arginine fait partie des sérines protéases, par exemple.
- les cystéines protéases contenant une cystéine dans leur site actif. Dans ces protéases, le rôle du nucléophile est joué par le soufre de la cystéine, sous forme de thiolate déprotoné. Les cystéines protéases comprennent, par exemple, les caspases, protéases qui interviennent dans le processus d'apoptose ou mort cellulaire programmée.
- les protéases acides agissant à pH acide et possèdent un acide aspartique dans leur

site actif. Les protéases acides comprennent, par exemple, la pepsine qui est spécifique des liaisons peptidiques dans lesquelles est engagé un acide aminé aromatique.

- les métalloprotéases présentant un cation métallique, en général un atome de zinc, fixé fortement à la protéine par les chaînes latérales de plusieurs acides aminés. Le cation métallique intervient directement pour activer une molécule d'eau qui clive la chaîne peptidique. Les métalloprotéases comprennent, par exemple, les protéases de la matrice extracellulaire.

- les thréonines protéases dont le résidu d'acide aminé nucléophile de la triade catalytique est une thréonine. Les thréonines protéases comprennent, par exemple, les sous-unités catalytiques du protéasome.

Il existe des molécules capables de bloquer l'activité des protéases appellées des inhibiteurs de protéase. Les modes de blocage sont variés, ils peuvent aller d'un blocage par une autre protéine qui séquestre la protéase, à l'inactivation irréversible de résidus du site actif par un composé chimique (inhibiteur suicide), en passant par des analogues de peptides qui miment le substrat naturel.

Bien que présentes dans la base de données MEROPS (une base de données sur les peptidases, leurs substrats et leurs inhibiteurs, Rawlings *et al*., 2012), les protéines GASP sont classées dans la catégorie des inhibiteurs de protéase putatifs. En effet, même si une activité anti-trypsique a été démontrée pour le second domaine Kunitz de la protéine GASP-2 humaine (Nagy *et al.*, 2003), aucune activité inhibitrice de protéases n'avait été montrée pour les protéines entières. Cependant, au sein du laboratoire, Alexis Parenté a montré au cours de son travail de master Recherche que les protéines GASP entières sont capables d'inhiber la trypsine, une sérine protéase (résultats non publiés).

Les protéines GASP pourraient jouer un rôle dans la maturation de la myostatine grâce à leurs domaines inhibiteurs de protéases (WAP, Follistatine/Kazal, Kunitz, NTR). En effet, les domaines inhibiteurs de sérine protéases pourraient inhiber les protéases « furine-like » impliquées dans le clivage de la promyostatine, ce qui conduirait à une myostatine non clivée inactive. De plus, le domaine NTR des protéines GASP pourrait aussi inhiber directement les métalloprotéases BMP-1/tolloid impliquées dans la maturation de la myostatine par le clivage du propeptide (voir le chapitre 2.6.2.1.2. Biosynthèse de la myostatine).

Enfin, étant donné que *Gasp-1* et *Gasp-2* sont exprimés dans de nombreux tissus où la myostatine n'est pas présente à priori durant le développement embryonnaire et au stade

adulte, les protéines GASP pourraient participer à l'équilibre protéases/antiprotéases dans ces tissus et contrôler leur fonction au sein de l'organisme mais cela reste à démontrer.

À ce jour, la majorité des études portant sur ces deux protéines concernent leur rôle au cours du développement musculaire et squelettique par inhibition de la myostatine ou de GDF11, et non sur leur rôle potentiel d'inhibiteur de protéases.

2.6.2. Rôle des protéines GASP dans l'inhibition de la myostatine et GDF11

2.6.2.1. Généralités sur la myostatine

2.6.2.1.1. Fonctions et expressions de la myostatine

La myostatine (MSTN), aussi appelée GDF8 (Growth differentiation factor 8) est un membre de la superfamille des TGFβ (McPherron *et al*., 1997 ; Walker *et al*., 2016). Cette super-famille comprend plus de 30 ligands, structurellement apparentés, mais fonctionnellement différents. Cette famille peut être divisée en trois classes, la classe des TGFβ, la classe des BMP et la classe des activine/myostatine. La myostatine appartient à la sous-classe activine/myostatine. Comme les autres TGFβ, la myostatine est synthétisée comme une molécule précurseur où un prodomaine N-terminal est séparé du domaine mature C-terminal par une protéase de la famille des furines. Les ligands matures liés par des ponts disulfures initient la transduction du signal en engageant deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II (Yadin *et al*., 2016).

La myostatine est produite principalement dans les muscles squelettiques et plus faiblement dans le tissu adipeux, le coeur et les glandes mammaires (McPherron *et al*., 1997 ; Sharma *et al*., 1999 ; Manickam *et al*., 2008). La myostatine joue un rôle majeur dans l'inhibition de la croissance musculaire, limitant la taille et le nombre des fibres musculaires. En effet, l'extinction du gène *MSTN* ou l'inhibition de la myostatine déclenchent des phénotypes d'hyper-musculature chez les mammifères et également les poissons (Mosher *et al*., 2007 ; Medeiros *et al*., 2009 ; McPherron *et al*., 1997 ; Lin *et al*., 2002 ; Zimmers *et al*., 2002 ; Kambadur *et al*., 1997 ; Williams, 2004 ; Clop *et al*., 2006 ; Bouyer *et al*., 2014). Ainsi, les souris knock-out pour la myostatine sont caractérisées au niveau musculaire par une hypertrophie et une hyperplasie des fibres musculaires (McPherron *et al*., 1997). Des défauts d'expression de la myostatine sont également associés à un phénotype osseux (Elkasrawy et Hamrick, 2010 ; ***figure 9***). De plus, il a été montré que la myostatine régule la réparation des fractures en inhibant le recrutement et la prolifération des cellules progénitrices (Kellum *et al*., 2009). La myostatine est aussi impliquée dans l'adipogenèse, le métabolisme du glucose

postnatal (McPherron et Lee, 2002 ; voir le chapitre 3.2. Syndrome métabolique) et la différenciation des glandes mammaires où il est observé une corrélation inverse entre l'expression de la myostatine et la différenciation mammaire (Manickam *et al*., 2008). La myostatine joue également un rôle au niveau du coeur où il a été observé que sa sur-expression réduit la masse cardiaque et la prolifération des cardiomyocytes (Artaza *et al*., 2007).

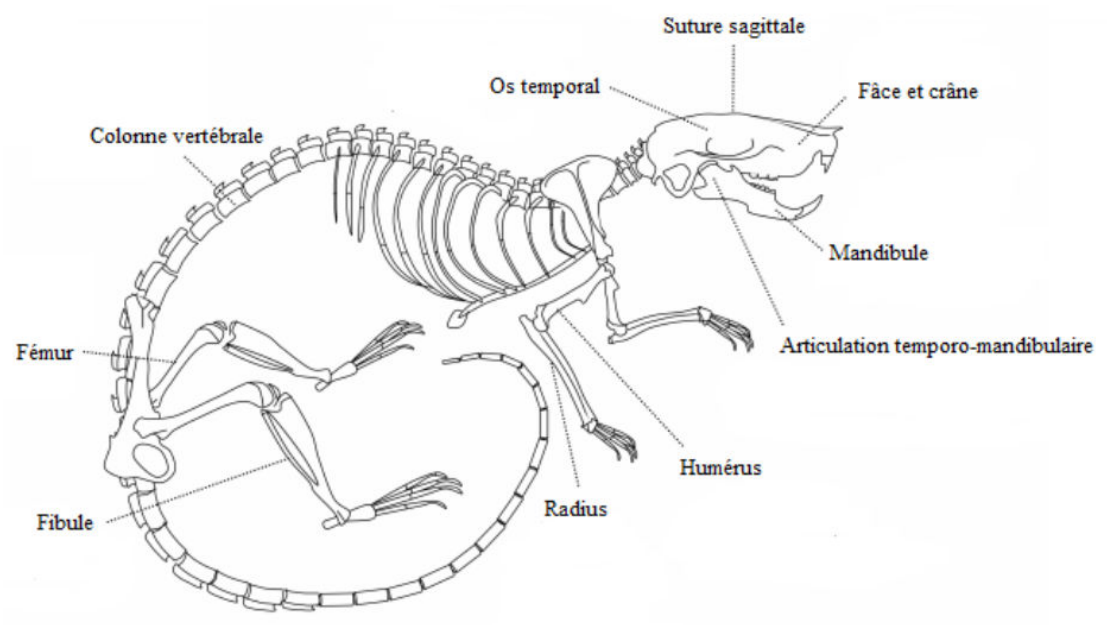


Figure 9 : Changements osseux associés à la perte de la myostatine chez la souris

Les souris knock-out pour la myostatine sont associées à de nombreux changements squelettiques. Au niveau de la colonne vertébrale, la taille du site d'attachement des muscles, le contenu minéral, la densité osseuse et l'épaisseur osseuse, augmentent. La masse et la densité osseuse augmentent au niveau de l'os temporal, de la mandibule, des articulations temporo-mandibulaires et du fémur. La forme de la suture sagittale se complexifie. Au niveau de la face et du crâne, la forme s'altère avec la mise en évidence d'une brachycéphalie plus accentuée. Pour l'humérus, le contenu minéral et l'épaisseur osseuse aux sites d'attachement des muscles augmentent tandis que la densité osseuse ne change pas. Pour des souris knock-out pour la myostatine soumises à un exercice, il est observé que la dureté osseuse du radius augmente en comparaison à des souris sauvages soumises au même exercice. Enfin, dans le cas de fracture du péroné (Fibula), la taille de la zone de réparation des fractures augmente, ce qui suggère que la myostatine jouerait un rôle dans la réparation osseuse.

(D'après Elkasrawy et Hamrick, 2010).

2.6.2.1.2. Biosynthèse de la myostatine

La myostatine est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif qui subit plusieurs étapes de maturation pour devenir actif. Deux clivages protéolytiques permettent la libération de la forme bioactive de la protéine (***figure 10***). Le premier clivage a lieu dans la lumière du réticulum endoplasmique et a pour fonction l'élimination du peptide signal. Le second clivage a lieu dans l'appareil de Golgi et permet la séparation du prodomaine (ou propeptide) et du domaine C-terminal. Ce clivage est réalisé au niveau d'une séquence consensus Arg-Ser-Arg-Arg (RSRR) par des protéases de la famille des subtilisines telle que la furine (Lee et McPherron, 2001). Suite à ces clivages, le dimère C-terminal et le propeptide restent liés de façon non covalente et forment un complexe latent qui est sécrété dans la circulation sanguine et qui est incapable de se lier aux récepteurs de la myostatine et de GDF11 (Thies *et al*., 2001). Il a cependant été montré pour la myostatine que certaines furines agissaient extracellulairement pour cliver le prodomaine du dimère de myostatine mature (Anderson *et al*., 2008). Une dégradation protéolytique du propeptide libère finalement le peptide bioactif. Elle fait intervenir la métalloprotéase BMP-1/TLD (Wolfman *et al*., 2003).

Il existe une forme intermédiaire entre le complexe latent et le dimère C-terminal mature, le complexe semi-latent où une seule molécule de propeptide est liée au dimère C-terminal mature. Contrairement au complexe latent, le complexe semi-latent est capable de se fixer à ses récepteurs et de déclencher les cascades de signalisation, mais de manière moins efficace que le dimère C-terminal libre (Szláma *et al*., 2013 ; Walker *et al*., 2016).

Comme les autres TGFβ, le prodomaine de la myostatine aide au repliement du ligand mature dimérique respectif (Funkenstein et Rebhan, 2007 ; Gray et Mason, 1990) (***figure 10***)

2.6.2.1.3. GDF11

La myostatine partage 90% d'identité de séquence protéique dans son domaine mature avec un autre membre des TGFβ, GDF11 (McPherron *et al*., 1999) et leurs prodomaines ne sont identiques qu'à 52%. GDF11 est exprimée dans de nombreux tissus (Nakashima *et al*., 1999) et joue un large rôle durant le développement des mammifères en régulant la formation du squelette, des reins, de l'estomac, de la rate, du pancréas, de la rétine, de la face mais aussi participe à la neurogenèse (***figure 11***) (McPherron *et al*., 1999 ; Esquela et Lee, 2003 ; Harmon *et al*., 2004 ; Liu, 2006 ; Kim *et al*., 2005 ; Lee et Lee, 2015).

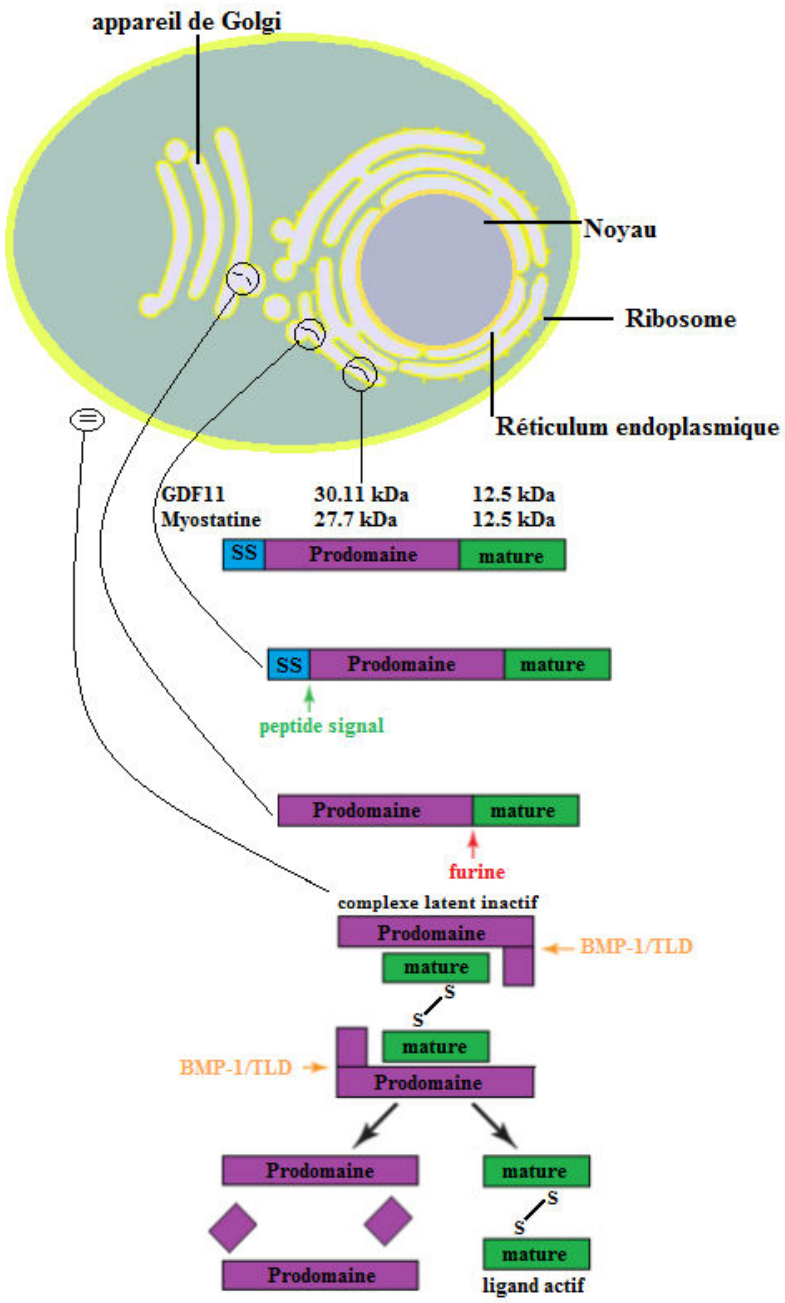


Figure 10 : Biosynthèse et processus protéolytique de GDF11 et la myostatine

GDF11 et la myostatine sont synthétisées sous la forme d'un précurseur inactif comprenant une courte séquence signal amino-terminale pour la sécrétion (SS), un prodomaine et un domaine mature directement dans le réticulume endoplasmique.

Il existe une forme intermédiaire entre le complexe latent et le dimère C-terminal mature, le complexe semi-latent où une seule molécule de propeptide est liée au dimère C-terminal mature. Contrairement au complexe latent, le complexe semi-latent est capable de se fixer à ses récepteurs et de déclencher les cascades de signalisation, mais de manière moins efficace que le dimère C-terminal libre (Szláma et al., 2013).

(D'après la revue Walker et al., 2016).

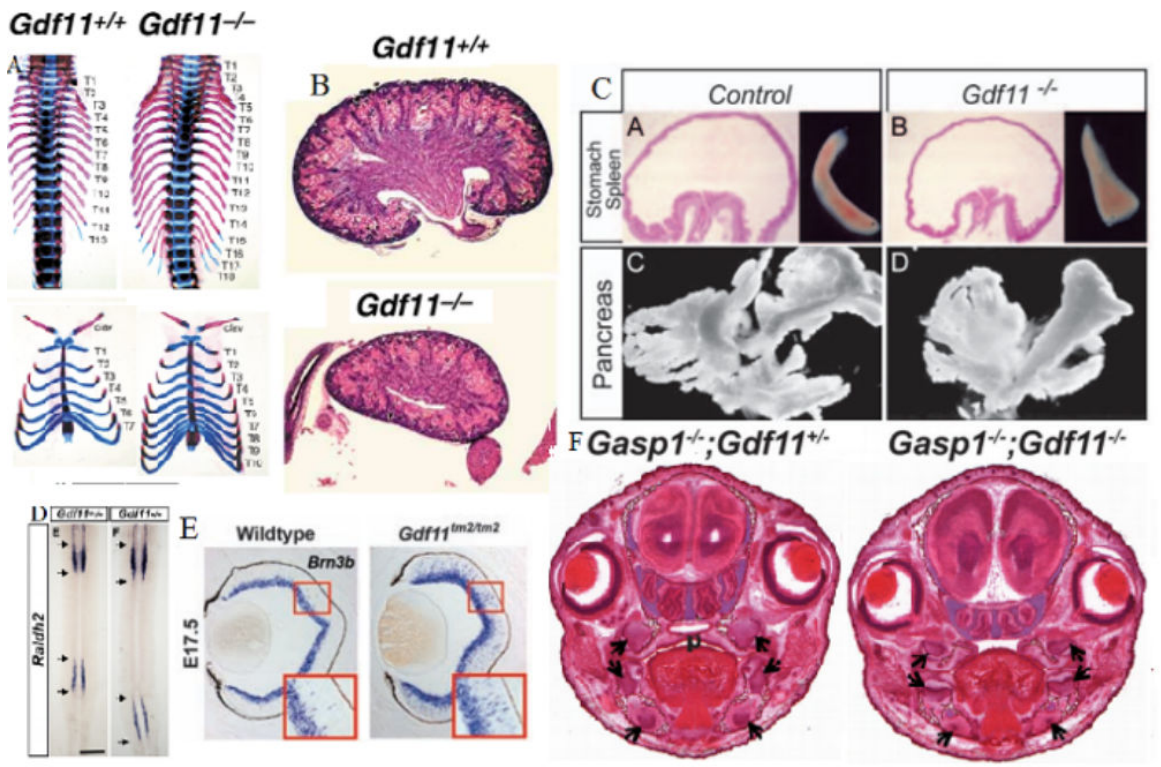


Figure 11 : GDF11 exerce de nombreuses fonctions durant le développement embryonnaire

Les souris knock-out pour GDF11 présentent des défauts squelettiques tels que des côtes supplémentaires(A). Elles possèdent des reins sous-développés (B). Ces souris sont caractérisées par des malformations de l'estomac, de la rate et du pancréas (C) et montrent des défauts dans la formation de la chorde spinale tels que des déplacements dans les domaines d'expressions de différents gènes impliqués dans la neurogenèse (D). Les souris knock-out pour GDF11 présentent également des défauts dans la formation de la rétine (E) et des malformations de la face (F).

(D'après McPherron et al., 1999 ; Esquela et Lee, 2003 ; Harmon et al., 2004 ; Liu, 2006 ; Kim et al., 2005 ; Lee et Lee, 2015).

La fonction de GDF11 dans les tissus adultes a été peu explorée à cause de la mortalité périnatale des souris knock-out pour GDF11. Cependant, des travaux récents ont identifié GDF11 comme une molécule candidate de régulation du vieillissement dans plusieurs organes (***figure 12***) (Loffredo *et al*., 2013 ; Katsimpardi *et al*., 2014 ; Sinha *et al*., 2014). Les souris doubles knock-out pour GDF11 et la myostatine montrent plus de transformations squelettiques que celles observées chez les souris simple knock-out pour GDF11 alors que la délétion spécifique de GDF11 dans les muscles squelettiques n'affecte pas le phénotype musculaire chez les souris sauvages ou knock-out pour la myostatine. Cela suggère que GDF11 et la myostatine ont des fonctions redondantes dans la régulation de la formation du

squelette, mais pas dans la régulation de la masse musculaire. Cependant, il n'est pas possible d'exclure que les protéines GDF11 sécrétées par d'autres organes viennent compenser l'absence de GDF11 au niveau des muscles squelettiques (McPherron *et al*., 2009).

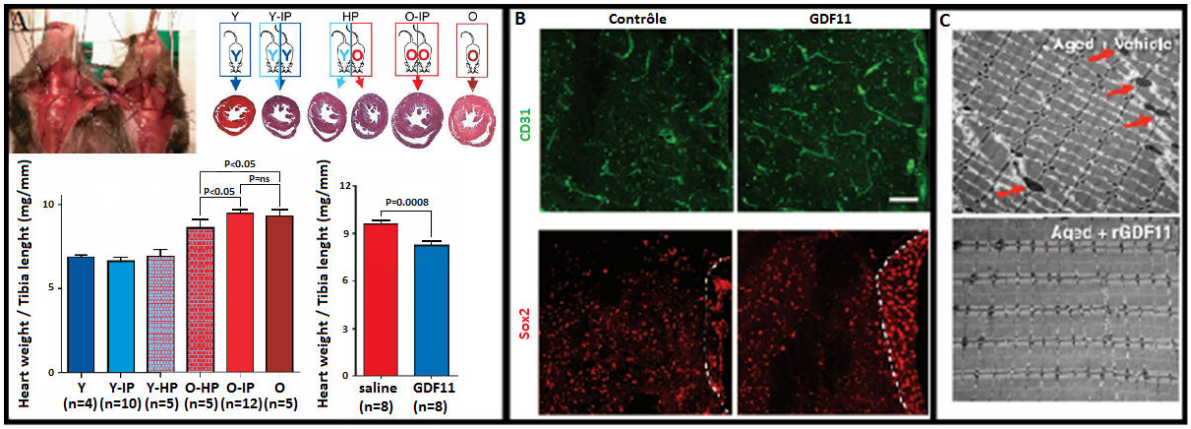


Figure 12: GDF11 exerce de nombreuses fonctions chez l'adulte

A) Le fait de relier la circulation sanguine d'une souris âgée à celle d'une souris jeune entraîne une augmentation de la masse cardiaque chez la souris jeune et une baisse de la masse cardiaque chez la souris âgée. Cet effet est principalement causé par GDF11.

B) La concentration sanguine de GDF11 est plus élevée chez les souris jeunes comparés aux souris âgées. Des souris âgées traitées avec GDF11 voient une amélioration de la vascularisation et de la neurogenèse.

C) Des souris âgées traitées avec GDF11 voient une amélioration de leurs muscles squelettiques.

(D'après Loffredo et al., 2013 ; Katsimpardi et al., 2014 ; Sinha et al., 2014).

2.6.2.2. Rôles des protéines GASP dans les fonctions contrôlées par GDF11 et la myostatine

2.6.2.2.1. Modes de liaison des protéines GASP à la myostatine et GDF11

Comme les autres TGFβ, la myostatine et GDF11 excercent leurs fonctions via la voie canonique des SMAD, en se liant à un récepteur kinase de type II, ActRIIB étant le récepteur majoritairement utilisé. Ce récepteur s'associe à un récepteur kinase de type I (par exemple ALK5) et ce complexe active à son tour la voie canonique des SMAD. Il existe également des voies dites non canoniques qui sont activées par la myostatine mais qui ne sont pas activées en général par les autres TGFβ. La voie ERK(1/2) fait par exemple partie de cette catégorie. Les molécules de follistatine et de FSTL3 peuvent inhiber plusieurs membres des TGFβ et

embrassent symétriquement le ligand pour bloquer les épitopes des récepteurs (Cash *et al*., 2009 ; Cash *et al*., 2012), tandis que GASP-1 et GASP-2 inhibent sélectivement GDF11 et la myostatine (Lee et Lee, 2013). Il faut cependant noter que les protéines GASP-1 et GASP-2 peuvent également se lier à d'autres membres des TGFβ, mais sans inhiber leurs fonctions (Szláma *et al*., 2010).

Contrairement à ce qu'il se passe pour la follistatine, FSTL3 et GASP-2, où deux molécules d'inhibiteurs sont indispensables pour inhiber un dimère actif de myostatine, une seule molécule de GASP-1 est nécessaire (Walker *et al*., 2015 ; ***figure 13***). De plus, une étude de 2016 indique que GASP-1 bloque l'hétérodimérisation des récepteurs ActRIIB/ALK5 et inhibe la voie canonique des SMAD alors que GASP-2 inhibe la voie canonique des SMAD sans bloquer l'hétérodimérisation des récepteurs ActRIIB/ALK5 (Khalil *et al*., 2016).

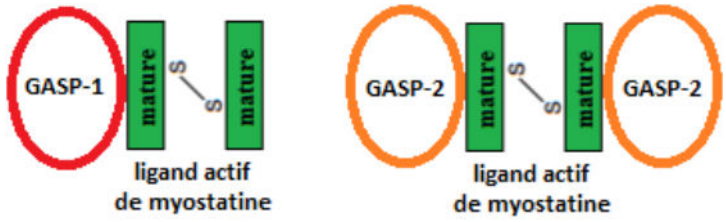


Figure 13 : Les deux modes de liaison des protéines GASP à la myostatine

GASP-1 qui est 100 fois plus puissant que GASP-2 se lie à la mysotatine en un complexe asymétrique alors que GASP-2 se lie à la myostatine en un complexe symétrique. De plus, la troncature du domaine C-terminal de GASP-1 résulte en un inhibiteur de la myostatine moins puissant qui forme un complexe symétrique avec la myostatine active.

(D'après Walker et al., 2015).

Il a été montré en 2003 que les protéines GASP-1 murine et humaine sont retrouvées liées à la myostatine et au propeptide dans le sérum chez les deux espèces, contrairement aux protéines GASP-2 murine et humaine qui ne sont pas retrouvées liées à la myostatine dans le sérum (Hill *et al*., 2003). En 2008, il a été rapporté que la protéine GASP-2 humaine peut se lier à la myostatine et au propeptide, l'interaction avec le dimère de myostatine mature se faisant par le domaine follistatine et l'interaction avec le propeptide se faisant par le domaine NTR (Kondás *et al*., 2008). Étonnamment, il a été découvert en 2013 que contrairement à la protéine GASP-1 murine, la protéine GASP-1 humaine n'avait pas d'affinité avec le propeptide (Szláma *et al*.,

2013). Dans cette même étude, les auteurs indiquent que le complexe latent de la myostatine possède une activité non nulle bien que beaucoup plus faible que celle du dimère actif et qu'il existe un état intermédiaire entre le complexe latent inactif de myostatine et le dimère de myostatine actif, appelé complexe semi-latent où une seule molécule de propeptide est liée au dimère de myostatine actif. Il a été également révélé que GASP-2 a deux fois plus d'affinité avec le complexe semi-latent que GASP-1. Cependant, GASP-1 a cent fois plus d'affinité pour le dimère de myostatine actif que GASP-2 (Walker *et al*., 2015). Cette capacité des protéines GASP à inhiber la myostatine et GDF11 se retrouve dans les fonctions altérées par la sous- ou sur-expression de ces protéines.

2.6.2.2.2. Étude in vitro portant sur les fonctions des protéines GASP

En 2012, par une première étude *in vitro*, nous avons montré au laboratoire que la sur-expression de la protéine GASP-1 augmente la prolifération des cellules C2C12, une lignée cellulaire de myoblastes murins (Brun *et al*., 2012). Une seconde étude a porté sur des myoblastes primaires murins sur-exprimant ou non GASP-1 établis à partir de souris TgGasp-1 ou de souris sauvages (Brun *et al*., 2014). Cette étude montre que l'absence d'hyperplasie observée chez les souris TgGasp-1 est dûe à une sur-expression de la myostatine, conséquence de la sur-expression de GASP-1 durant l'embryogenèse. En effet, durant l'embryogenèse, la myostatine agirait préférentiellement via la voie ERK1/2 pour réguler l'expression de Pax7 et contrôlerait ainsi la détermination et le nombre de progéniteurs musculaires embryonnaires. Or la sur-expression de GASP-1 ne bloque pas l'activation de la cascade ERK1/2 qui est induite par la myostatine. Cela préviendrait l'hyperplasie chez les souris sur-exprimant GASP-1. Chez les souris adultes, la myostatine agirait préférentiellement via la voie Smad2/3 pour réguler la prolifération cellulaire, la synthèse protéique et la taille des myofibres ; la sur-expression de GASP-1 bloque l'activation de la cascade Smad2/3 qui est induite par la myostatine. Récemment au laboratoire, nous avons étudié l'effet de la sur-expression de GASP-2 sur la prolifération et la différenciation des cellules C2C12, nous avons montré que les cellules C2C12 traitées avec la protéine GASP-2 voient leur prolifération et leur différenciation augmentées (Pèrié *et al*., 2016).

L'étude de la glycosylation de la protéine GASP-1 a aussi montré que la *N*-glycosylation de GASP-1 n'était pas essentielle pour sa fonction, mais était nécessaire pour une bonne sécrétion de la protéine (Brun *et al*., 2012). Pour la protéine GASP-2, nous avons pu montrer

que son état de glycosylation n'était pas impliqué dans l'inhibition de la myostatine (Pèrié *et al*., 2016).

Afin de mieux comprendre les fonctions *in vivo* des protéines GASP, plusieurs études basées sur la création et la caractérisation de modèles animaux ont également été entreprises.

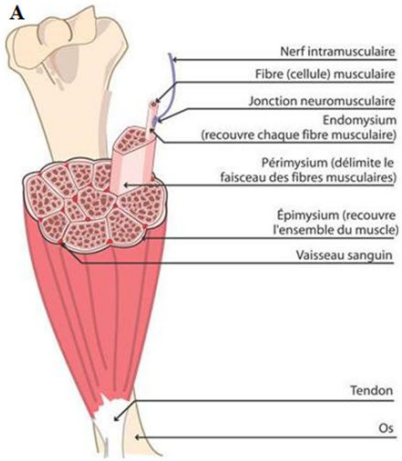
3. Contribution des modèles animaux pour l'étude des fonctions des protéines GASP

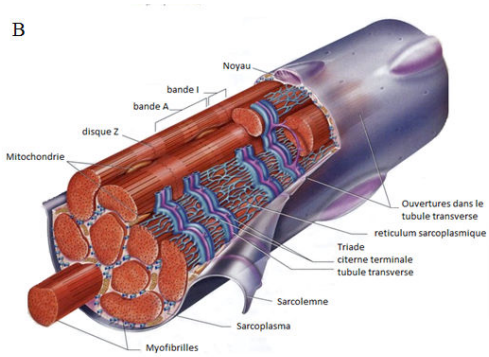
Comme de nombreuses études *in vitro* ont prouvé l'interaction entre les protéines GASP et la myostatine ou GDF11, des études fonctionnelles ont été conduites afin de mieux comprendre la fonction de ces protéines dans les processus biologiques conduits par la myostatine et GDF11.

3.1. Phénotype musculaire des modèles de sous- ou sur-expression des protéines GASP

L'analyse phénotypique du tissu musculaire, lors de la sur-expression des inhibiteurs de la myostatine ou lors du knock-out de celui-ci, passe par l'étude de la quantité et de la qualité des fibres musculaires. En effet, le tissu musculaire squelettique est un système complexe (***encart 1***). Il est formé d'un nombre important de faisceaux musculaires composés de 20 à 80 fibres. Ces fibres musculaires sont des cellules allongées et polynucléées issues de la fusion de plusieurs centaines de cellules précurseurs, les myoblastes. Les fibres musculaires des mammifères sont classées en quatre groupes, les types I, IIa, IIx et IIb, d'après les isoformes de myosine (MyHC) qui les composent et leurs capacités glycolytiques et oxydatives **(*encart 1*)**. L'identité de ces fibres musculaires est déterminée dès le stade embryonnaire par des processus myogéniques intrinsèques puis modulée au stade adulte par des facteurs hormonaux et neuronaux et par l'activité physique. La proportion relative des types de fibres qui composent le muscle, le nombre de fibres (hyperplasie) ainsi que l'aire des fibres (hypertrophie) sont des paramètres importants lors de l'analyse phénotypique musculaire d'une lignée mutante.

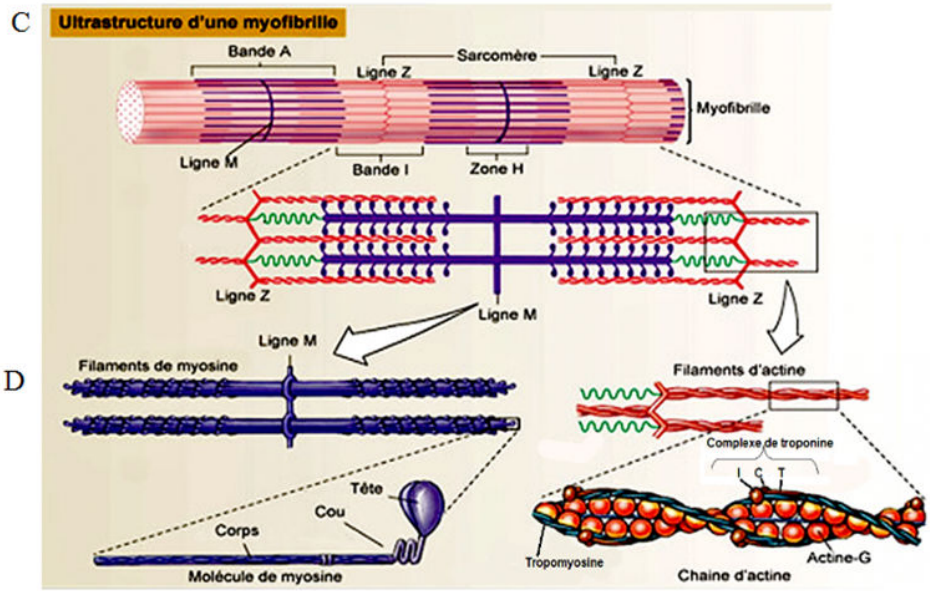
Encart 1 : Structure et caractéristiques des muscles squelettiques





A) *Le muscle squelettique est rattaché aux os par des tendons et est lui-même un ensemble de faisceaux musculaires enveloppé par du tissu conjonctif, l'épimysium. Chaque faisceau musculaire est entouré par le périmysium et est composé de plusieurs fibres musculaires qui sont entourées par l'endomysium.*

B) *Les fibres musculaires striées sont des cellules polynucléées, dont les nombreux noyaux sont répartis à la périphérie de la fibre. Elles peuvent mesurer jusqu'à 30 cm de long pour un diamètre variant de 10 à 100 µm. Environ 80% du volume de la fibre musculaire est occupé par des myofibrilles qui sont des structures cytosquelettiques très organisées de 1 à 2 µm de diamètre permettant aux fibres musculaires de se contracter. Chaque myofibrille est implantée dans le cytoplasme de la cellule que l'on désigne sous le nom de sarcoplasme. Tout le contenu de la cellule est enveloppé dans une membrane plasmique : le sarcolemme. Chaque myofibrille est entourée par du réticulum sarcoplasmique (réticulum endoplasmique musculaire) selon une organisation rigoureuse. À intervalles réguliers, le réticulum sarcoplasmique émet des protubérances appelées citernes terminales (à la jonction bande A/bande I). À ces niveaux se trouvent également des invaginations de la membrane cytoplasmique appelées tubules transverses. Un tubule transverse en étroite association avec deux citernes terminales, forme une triade. La triade est une zone fonctionnelle qui est reliée au nerf intramusculaire (ou nerf moteur). En effet, le tubule transverse est situé autour de la myofibrille, mais s'échappe aussi de la fibre par le sarcolemme et est directement relié avec le nerf intramusculaire qui est situé sur la fibre, par des jonctions neuromusculaires communicantes. Cette organisation joue un rôle important dans le couplage excitation-contraction.*



C) *Toutes les myofibrilles d'une même fibre sont parfaitement alignées et parallèles. Elles sont très longues et allongées, d'un diamètre allant de 1 à 2 µm, et dont la longueur peut aller jusqu'à 50 cm. Elles sont dites striées, à cause de leur aspect sur le plan de leur longueur, sur le plan longitudinal. En effet, observées de ce plan, les myofibrilles sont constituées de stries. Chaque strie est composée d'une bande sombre (A pour anisotrope) et d'une bande claire (I pour isotropes), l'ensemble des deux formant un sarcomère. On observe sur ce schéma la succession des bandes claires (I) et des bandes sombres (A), sur chaque myofibrille. Les bandes claires (I), ont une séparation axiale appelée strie Z. Les bandes sombres (A), ont une partie axiale assez large, appelée zone H (Henzen), elle-même ayant une séparation axiale nommée ligne M.*

Un sarcomère est délimité par deux bandes Z et regroupe une bande A et deux demi-bandes I. Les myofibrilles sont donc constituées de multiples sarcomères reliés entre eux par les stries Z.

D) *Chaque bande de sarcomère est constituée par association de filaments que l'on appelle myofilaments. Il en existe deux sortes: les myofilaments épais (myosine) et les myofilaments fins (actine). Ils sont répartis de la façon suivante dans le sarcomère : les bandes I sont constituées uniquement de myofilaments fins associés de part et d'autre de la strie Z ; les bandes A sont constituées des deux myofilaments à la fois (fins et épais). La partie H, axée centralement dans la bande A, a quant à elle uniquement des myofilaments épais disposés de façon opposée de part et d'autre de l'axe M.*

Les sarcomères sont l'unité contractile du muscle et sont consolidés par des protéines de structure comme la desmine qui attache, au niveau des lignes M et des stries Z, les diverses myofibrilles entre elles ou la titine qui lie les chaînes de myosine aux stries Z. Le myofilament épais (myosine) est une protéine formée en longueur et composée de deux parties: la tête et la queue. La tête comporte une enzyme qui intervient au cours de l'hydrolyse de la molécule d'ATP, molécule qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction musculaire.

Le myofilament fin (actine) est constitué par trois principales protéines différentes : l'actine G (globulaire), la tropomyosine et le complexe troponine. L'actine globulaire forme une double hélice autour de la tropomyosine alors que le complexe troponine est fixé sur cet ensemble.

Caractéristiques	***Lente – Oxydative*** ***Type I***	***Rapide – Oxydative*** ***Type IIa***	***Rapide – Glycolytique*** ***Type IIx***	***Rapide – Glycolytique*** ***Type IIb***
Isoformes de MyHC (Myosin Heavy Chain)	*MyHC I*	*MyHC IIa*	*MyHC IIx*	*MyHC IIb*
Structure				
Taille et diamètre	*Petit*	*Moyen*	*Gros*	*Gros*
Volume mitochondrial	+++	++	+	+
Activité ATPase de l'isoforme de MyHC	*Lente*	*Moyenne*	*Rapide*	*Rapide*
Enzyme oxydative	+++	++	+	+
Enzyme glycolytique	+	++	+++	+++
Réticulum sarcoplasmique	+	++	+++	+++
Contenu en glycogène	+++	+++	+	+
Contenu en lipide	+++	+	-	-
Contenu en myoglobine	+++	++	+	+
Vascularisation	+++	++	+	+
Fonctionnel				
Métabolisme	*Oxydatif*	*Mixte*	*Glycolytique*	*Glycolytique*
Résistance à la fatigue	+++	++	+	+
Force de contraction	+	++	+++	+++
Vitesse de contraction	+	++	+++	+++
Innervation par Unité motrice				
Taille de l'unité motrice (Fibres / motoneurone)	*10 à 180*	*300 à 800*	+	+
Diamètre du motoneurone	*Petit*	*Large*	+++	+++
Vitesse de conduction nerveuse	*Lente*	*Rapide*	+++	+++
Seuil de recrutement	*Bas*	*Élevé*	+	+

Le muscle est un tissu hétérogène qui possède de grandes capacités d'adaptation. Il est formé de fibres musculaires de plusieurs types classés en fonction de deux caractéristiques principales : leur vitesse maximale de contraction, c'est-à-dire la vitesse à laquelle les têtes de myosine se détachent de l'actine, et leur métabolisme préférentiel utilisé pour resynthétiser les molécules d'ATP. Les quatre types de fibres sont : I, IIa, IIx et IIb.

Les fibres contenant des myosines avec une forte activité ATPasique sont classées parmi les fibres à contraction rapide ou de type II. En revanche, les fibres dont les myosines ont une faible activité ATPasique sont définies comme des fibres lentes ou de type I. Les fibres du type I (fibres rouges oxydatives lentes) ont une faible vitesse maximale de contraction (Vmax) due à une myosine à activité ATPase lente ; elles sont donc peu puissantes. Ces fibres possèdent une capacité aérobie élevée et ne recourent que très peu au métabolisme anaérobie. Les fibres du type IIb (blanches glycolytiques rapides) ont une myosine à activité ATPase rapide leur conférant une Vmax élevée. Elles sont très puissantes mais peu endurantes et recourent préférentiellement au métabolisme anaérobie.

Les fibres de type IIx sont intermédiaires entres les fibres de type IIa et les fibres de type IIb (Schiaffino et al., 1989).

Les fibres du type IIa (roses oxydatives rapides) possèdent des caractéristiques intermédiaires comme leur Vmax, leur diamètre et leur endurance. Elles possèdent toutefois des capacités aérobies plus élevées que les fibres des types IIb/IIx. + : peu utilisé, ++ : utilisé de manière intermédiaire, +++ : grandement utilisé.

En 2008, il a été découvert que la sur-expression du gène *Gasp-1* par injection du vecteur viral AAV portant l'ADNc de *Gasp-1* directement dans des muscles de souris entraîne une augmentation de la masse musculaire (Haidet *et al*., 2008). Ainsi des souris, âgées de deux ans et injectées à quatre semaines, voient leur masse corporelle augmentée de 50%. La masse des muscles injectés (tibialis anterior, gastrocnémien, quadriceps et triceps) augmente quant à elle de 10%.

Au laboratoire, dans l'objectif de mieux comprendre le rôle de la protéine GASP-1, un modèle de souris sur-exprimant GASP-1 de façon ubiquitaire a été crée et caractérisé au niveau phénotypique (Monestier *et al*., 2012a). Ces souris ont été générées via l'intégration aléatoire dans le génome de souris de fond génétique FVB d'un transgène portant la séquence correspondante à l'ADNc de *Gasp-1* sous le contrôle du promoteur CMV. Ces souris transgéniques ont été appelées TgGasp-1.

En 2013, une autre étude s'est intéressée à la caractérisation phénotypique de souris knock-out pour *Gasp-1* ou pour *Gasp-2* et a montré une légère réduction de la masse musculaire chez ces souris (Lee et Lee, 2013). Pour plus de clarté, les différents phénotypes musculaires observés sont rapportés dans le ***tableau 3A*** et ***3B***.

Caractérisation des souris TgGasp-1	
Phénotype chez les souris TgGasp-1	**Phénotype chez les souris Mstn-/-**
Augmentation de la masse corporelle de 4.5 g à partir de 2 semaines	Augmentation de la masse corporelle
Augmentation de la masse du rectus femoris de 35% à 12 semaines Augmentation de la masse du pectoralis major de 45% à 12 semaines	Augmentation de la masse musculaire
Augmentation de la taille des fibres musculaires de 36%	Hypertrophie observée
Pas d'hyperplasie observée	Hyperplasie observée
Pas de variation dans le typage des fibres	Augmentation des fibres de type II

Tableau 2: A) Phénotype musculaire des souris TgGasp-1 et des souris Gasp-1-/- ou Gasp-2-/-

*(i) Chez les souris TgGasp-1, la sur-expression de GASP-1 entraîne une augmentation de la masse corporelle. En effet, bien qu'immédiatement après la naissance, les souris TgGasp-1 apparaissent semblables aux souris sauvages, après deux semaines, ces souris montrent une augmentation significative du poids du corps d'environ 4,5 g qui se maintient durant le reste de la vie des animaux. (ii) à partir de 8 semaines, les souris TgGasp-1 montrent un phénotype de muscles squelettiques hypertrophiés. Ainsi, la masse musculaire du rectus femoris et du gastrocnémien augmente de 35% à 12 semaines, tandis que la masse musculaire du pectoralis major augmente de 45%. (iii) cette augmentation de la masse musculaire est principalement dûe à une hypertrophie des fibres musculaires, c'est-à-dire une augmentation de l'aire des fibres musculaires de 36% en moyenne. (iv) aucune hyperplasie (augmentation du nombre de fibres musculaires) n'est observée chez ces animaux. Ceci diffère de l'observation faite chez les souris knock-out pour la myostatine qui sont caractérisées par une hyperplasie et une hypertrophie des fibres musculaires (**figure 14**). (v) contrairement aux souris knock-out pour la myostatine (caractérisées par une augmentation du nombre de fibres glycolytiques rapides de types II), aucune altération dans la composition des fibres musculaires n'est observée chez les souris TgGasp-1.*
(D'après Monestier et al., 2012a).

Caractérisation des souris knock-out *Gasp-1-/-* ou *Gasp-2-/-*	
Phénotype chez les souris *Gasp-1-/-* ou *Gasp-2-/-*	**Phénotype chez les souris Mstn-/-**
Pas d'augmentation de la masse musculaire à 10 semaines	Augmentation de la masse musculaire
À 8 mois, réduction de la masse musculaire de 5 à 12% chez les souris *Gasp-1-/-* À 8 mois, réduction de la masse musculaire de 6 à 9% chez les souris *Gasp-2-/-*	
Augmentation du ratio fibres IIa/IIb	Diminution du ratio fibres IIa/IIb
Diminution de la régénération musculaire	Augmentation de la régénération musculaire

Tableau 2: B) Phénotype musculaire des souris knock-out Gasp-1-/- ou Gasp-2-/-

(i) chez les souris knock-out (KO) pour Gasp-1 ou Gasp-2 et âgées de 10 semaines, aucune différence n'est observée entre les souris KO et les souris sauvages. (ii) à 8 mois, une légère différence apparaît chez les souris KO mâles, à savoir, une diminution de la masse musculaire de 5 à 12% chez les souris Gasp-1-/- et de 6 à 9% chez les souris Gasp-2-/-..
(iii) chez les souris KO pour Gasp-1 et Gasp-2, le ratio des fibres oxidatives rapides IIa sur les fibres glycolytiques rapides IIb semble augmenté. Cette augmentation des fibres oxidatives rapides IIa sur les fibres glycolytiques rapides IIb est l'inverse de ce qui est observé chez les souris knock-out pour la myostatine. (iv) les souris KO pour Gasp-1 et Gasp-2 sont caractérisées par une diminution de la régénération musculaire qui s'explique par le rôle joué par la myostatine dans ce processus (Wagner et al., 2005) et qui est l'inverse de ce qui observé chez les souris knock-out pour la myostatine qui sont caractérisées par une augmentation de la régénération musculaire.
(D'après Lee et Lee, 2013).

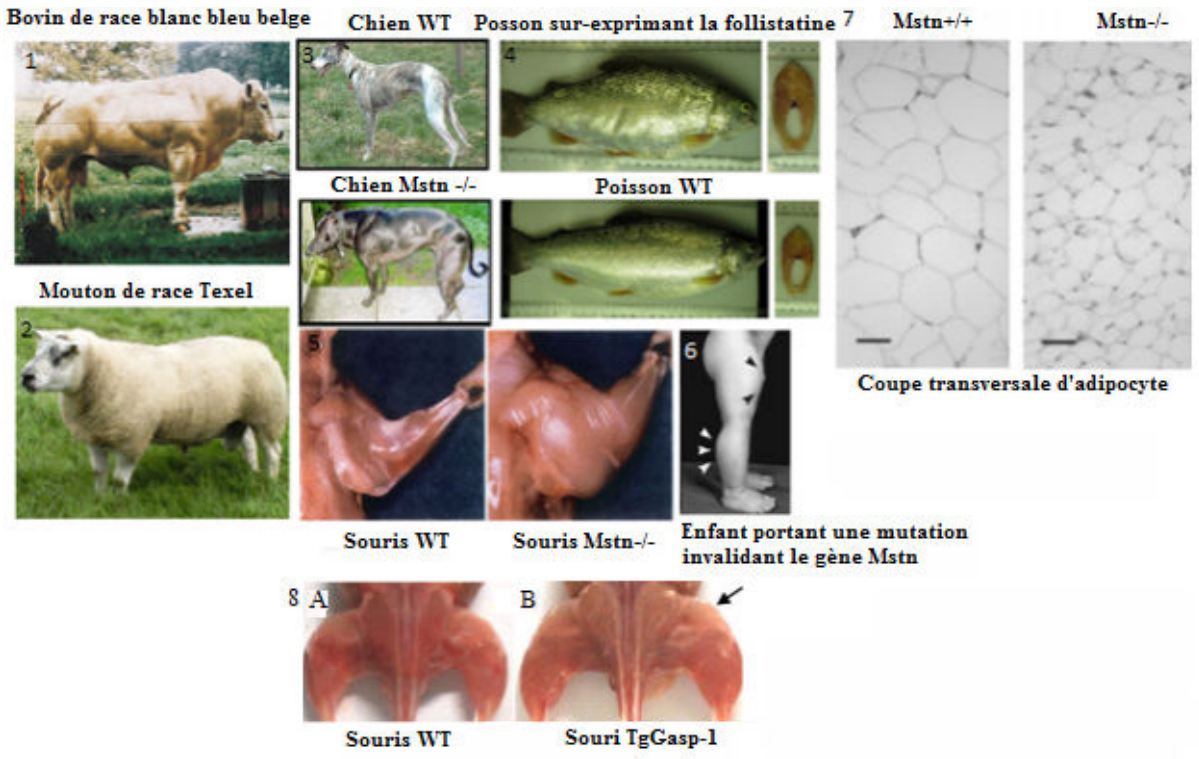


Figure 14 : Phénotypes observés associés à une mutation invalidant la myostatine ou sur-exprimant un de ses inhibiteurs

1) La race bovine blanc bleu belge, une race à viande, est caractérisée par une hypertrophie musculaire et porte une mutation dans l'exon3 du gène de la myostatine conduisant à l'absence de myostatine active. 2) La race ovine Texel renommée pour la qualité exceptionnelle de sa viande porte une mutation dans la séquence 3'UTR du gène de la myostatine qui crée un site de reconnaissance pour deux miRNA ce qui réduit la quantité de myostatine.

3) Certains individus de la race de chien whippet sont caractérisés par un phénotype d'hypermusculature causé par une mutation dans le gène de la myostatine. 4) Les truites sur-exprimant le gène de la follistatine (un inhibiteur de la myostatine) présentent un phénotype d'hypermusculature. 5) Les souris knock-out pour le gène de la myostatine présentent un phénotype d'hypermusculature. 6) Un enfant portant une mutation invalidant la myostatine sur les deux allèles a été identifié et est caractérisé par un phénotype d'hypermusculature. 7) La perte de la myostatine mène à une suppression partielle de l'accumulation de graisse et à un métabolisme du glucose anormal. 8) La sur-expression de GASP-1 entraîne un phénotype d'hypermusculature moins marqué que celui observé chez les animaux sous-exprimant la myostatine ou sur-exprimant la follistatine.

(D'après McPherron et al., 1997 ; Clop et al., 2006 ; Mosher et al., 2007 ; Medeiros et al., 2009 ; Lin et al., 2002 ; Williams, 2004 ; Monestier et al., 2012a).

3.2. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique correspond à l'association de plusieurs défauts du métabolisme comme une hyperglycémie, une augmentation de la masse graisseuse et une pression sanguine élevée. De nombreuses pathologies sont associées à ce syndrome, notamment le diabète de type II et l'obésité.

La myostatine semble jouer un rôle clé dans l'homéostasie du glucose et donc dans le syndrome métabolique. En effet, en plus de présenter une augmentation importante de leur masse musculaire, les souris Mstn-/- présentent également une diminution importante de leur masse adipeuse (Lin *et al*., 2002 ; McPherron et Lee, 2002). De plus, des travaux ont montré que les symptômes spécifiques de l'insulino-résistance sont diminués lorsque des modèles murins spécifiques de l'obésité ou du diabète sont croisés avec des souris Mstn-/- (McPherron et Lee, 2002). Enfin, les souris knock-out pour la myostatine présentent une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de l'adiposité qui les protègent de l'obésité (Zhang *et al*., 2012).

De façon étonnante, la sur-expression de GASP-1 ne s'accompagne pas de perte de masse adipeuse chez la souris jeune (Monestier *et al*., 2012a) mais entraîne chez les souris âgées de nombreux défauts métaboliques dont une augmentation de la masse graisseuse, une accumulation de gras ectopique, une hyperglycémie, une hyperinsulémie et une insulino-résistance hépatique et musculaire (Pèrié et *al*., en révision). Une des hypothèses avancée par le laboratoire pour expliquer l'augmentation de la masse adipeuse observée chez les souris TgGasp-1 est que la sur-expression de la myostatine par „up-regulation", observée dans cette lignée, serait directement responsable de l'augmentation de la masse du tissu adipeux.

3.3. Phénotype squelettique dans des modèles de sous-expression des protéines GASP

En 2013, des études s'intéressent à l'effet de la sous-expression des protéines GASP sur la formation du squelette (Lee et Lee, 2013). En effet, GDF11 qui est inhibée par les protéines GASP, est impliqué dans la formation du squelette. Ceci est démontré par le fait que des souris knock-out pour GDF11 présentent des transformations du squelette axial telles qu'une augmentation du nombre de vertèbres thoraciques. Ainsi, les souris sauvages présentent 13 vertèbres thoraciques alors que les souris knock-out pour GDF11 ont 4 à 5 paires de côtes en plus pour un total de 17 à 18 segments thoraciques (McPherron et al., 1999).

Pour en savoir plus sur le rôle des protéines GASP sur la formation du squelette, l'équipe de Lee a généré des souris knock-out pour *Gasp-1* ou *Gasp-2*. Le squelette des souris knock-out pour *Gasp-1* est similaire à celui des souris sauvages. Au contraire, les souris knock-out pour *Gasp-2* montrent des transformations du squelette. Ainsi, 90% des souris knock-out pour *Gasp-2* ont leur 13ème côte tronquée ou absente alors que 40% de ces souris ont leur paire de 13ème côtes absente. Cela reflète une transformation du 13ème segment thoracique en segment lombaire. De plus, 12% de ces souris ont une perte partielle ou complète d'un segment lombaire. Dans la région cervicale, d'autres anomalies plus rares ont été observées comme une côte surnuméraire venant de la 7ème vertèbre cervicale. Enfin, des souris doubles knock-out pour *Gdf11* et *Gasp-2* présentent les mêmes défauts que les souris knock-out pour *Gdf11*, ce qui suggère que l'effet de GASP-2 sur la formation du squelette a lieu uniquement via l'inhibition de GDF11. Les souris doubles knock-out pour *Gasp-2* et *Gasp-1* ont les mêmes caractéristiques squelettiques que les souris knock-out pour *Gasp-2*. Il n'y a donc pas de redondance de fonction entre les protéines GASP pour ce qui concerne la formation du squelette. Les souris knock-out pour la follistatine (un inhibiteur de la myostatine et de GDF11) présentent également des défauts dans la formation du squelette. Ainsi, 90% de ces souris ont au moins une de leur 13ème côte tronquée et 30 % ont leur paire de 13ème côtes absente (Matzuk *et al.*, 1995). Les souris doubles knock-out pour *Gasp-2* et la follistatine ont des défauts squelettiques plus marqués que les mutants simples avec notamment 100% des souris avec leurs 13ème côtes absentes (Lee et Lee, 2013).

Concernant la formation de la face, des souris knock-out pour la follistatine ou *Gdf11* arborent des becs de lièvre. Ce phénotype n'est pas observé pour les souris knock-out pour *Gasp-1* ou *Gasp-2*. Les souris doubles knock-out pour *Gasp-2* et *Gdf11* ne montrent pas plus de bec de lièvre que les souris knock-out pour *Gdf11*. Au contraire, les souris doubles knock-out pour *Gasp-1* et *Gdf11* sont caractérisées par un nombre beaucoup plus important de becs de lièvre que les souris knock-out pour *Gdf11*. Ceci suggère un rôle de GASP-1 dans la formation de la face (Lee et Lee, 2013). Une autre étude en 2015 confirme cette fonction puisqu'il est observé que les souris doubles knock-out pour *Gasp-1* et *Gdf11* présentent des malformations des incisives. (Lee et Lee, 2015).

3.4. Différences entre les modèle de souris KO pour la myostatine et de souris TgGasp-1

Les souris knock-out pour la myostatine sont caractérisées par une hyperplasie et une hypertrophie des fibres musculaires ainsi que par une diminution de la masse graisseuse

(Monestier *et al*., 2012a ; McPherron *et al*., 1997). Comme indiqué dans le ***tableau 3***, les souris TgGasp-1 qui sur-exprimment *Gasp-1* sont caractérisées par un phénotype d'hyper-musculature qui correspond à une hypertrophie des fibres musculaires sans hyperplasie accompagnée d'une augmentation de la masse graisseuse chez les souris âgées (Monestier *et al*., 2012a ; Périè *et al.,* en révision). Une explication possible de la différence de phénotype observé concernant l'hyperplasie entre les souris knock-out pour la myostatine et les souris TgGasp-1 a été fournie par l'étude de Brun *et al*. (2014). En effet, l'inhibition de la myostatine par la sur-expression de GASP-1 s'accompagne d'une sur-expression de la myostatine par la mise en place d'une boucle de rétro-contrôle négative qui fait intervenir la voie canonique des SMAD et SMAD7 (Forbes *et al*., 2006 ; Brun *et al*., 2014). De plus, GASP-1 ne serait capable que d'inhiber l'activation de la voie canonique des SMAD via l'inhibition de la myostatine mais n'aurait pas d'effet sur l'activation de la voie ERK1/2 par la myostatine. Or, la myostatine contrôle la masse musculaire via la cascade ERK1/2 durant l'embryogenèse et via la voie canonique des SMAD durant la croissance musculaire post-natale. En conséquence, durant l'embryogenèse, GASP-1 n'inhiberait pas l'activation de la cascade ERK1/2 par la myostatine alors qu'elle pourrait inhiber l'activation de la voie canonique des SMAD par la myostatine durant la croissance postnatale. Ceci pourrait expliquer l'absence d'hyperplasie observée chez les souris TgGasp-1, le nombre des fibres musculaires étant déterminé durant l'embryogenèse.

Projet de thèse

Au regard des résultats déjà obtenus dans le laboratoire sur l'étude du rôle des protéines GASP dans le développement musculaire, mes travaux de thèse se sont articulés autour de deux projets qui concernent (i) la création et l'analyse phénotypique d'un modèle murin surexprimant la protéine GASP-2 et (ii) l'étude de données transcriptomiques et protéomiques dans un contexte de sur-expression de GASP-1.

1. Étude *in vivo* de la protéine GASP-2

Il existe plusieurs moyens d'inhiber l'expression de la myostatine, hormis la création de modèle knock-out pour la myostatine. Les moyens les plus étudiés sont la sur-expression du propeptide de la myostatine ou la sur-expression de la follistatine (Li *et al*., 2010 ; Nazari *et al*., 2014).

Une autre voie de recherche est la sur-expression de deux autres inhibiteurs de la myostatine, les protéines GASP. Dans cette optique, le laboratoire a généré deux modèles murins sur-exprimant les protéines GASP, les souris TgGasp-1 et les souris TgGasp-2. Dans un premier temps, nous avons caractérisé les souris TgGasp-1 et montré qu'elles présentent un phénotype d'hypermusculature qui correspond à une hypertrophie des fibres musculaires sans hyperplasie (Monestier *et al*., 2012a). La caractérisation du phénotype des souris TgGasp-2 est le principal objectif de cette thèse et sera détaillée dans la partie **Résultats**.

2. Analyses des données transcriptomiques dans un contexte de sur-expression de GASP-1

GASP-1 et GASP-2 font partie d'un réseau génique incluant la myostatine mais également un ensemble de protéines participant aux voies de signalisation des TGFβs. Si la protéine GASP-1, de par son action antagoniste sur la myostatine, présente un intérêt, il convient d'étudier plus en détail l'action de sa sur-expression sur l'interactome dans lequel elle participe. De plus, la sur-expression de GASP-1 pourrait également activer ou inhiber d'autres voies de signalisation non liées à la myostatine. Pour cela, des analyses transcriptomiques et protéomiques permettraient de vérifier les voies de signalisation modulées par GASP-1. Ainsi, le laboratoire a réalisé une étude transcriptomique sur des cellules musculaires primaires sur-exprimant ou non GASP-1 et une étude protéomique à partir du quadriceps de souris sur-exprimant ou non GASP-1. Une seconde partie de cette thèse portera sur l'analyse bio-informatique des résultats de ces études transcriptomiques et protéomiques et sera donnée dans la partie **Résultats**.

Matériels et méthodes

1. Matériels biologiques

1.1. Lignées murines et cellulaires

Trois lignées murines ont été utilisées : (i) la lignée TgGasp-1, lignée murine de fond génétique FVB/N sur-exprimant la protéine GASP-1. Les souris TgGasp-1 présentent un développement musculaire plus marqué en comparaison à des souris sauvages dû à une hypertrophie des fibres musculaires mais sans hyperplasie (Monestier *et al*., 2012a, Brun *et al*., 2014).

(ii) la lignée Mstn -/-, inactivée pour le gène de la myostatine. Les souris Mstn -/- présentent une hypermusculature dûe à une hypertrophie et une hyperplasie des fibres musculaires. De plus, une diminution du tissu adipeux est observée (Grobet *et al.*, 2003)

(iii) la lignée FVB, servant de contrôle.

A partir de muscles des membres postérieurs des lignées TgGasp-1 et FVB, ont été dérivés des myoblastes primaires, nommés S20 (myoblastes issus des TgGasp-1.20) et FVB (myoblastes issus des souris sauvages FVB).

1.2. Plasmide : pcDNA3.1-V5/His

Le plasmide pcDNA3.1-V5/His (Thermo Fisher Scientific ; ***figure 21***) est utilisé pour exprimer des protéines dans des cellules de mammifères. Il permet une fusion traductionnelle de la protéine d'intérêt avec l'épitope V5 et une étiquette polyhistidine. Le promoteur CMV, entraîne une expression constitutive de la protéine d'intérêt. Les gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine permettent respectivement la sélection des transformants bactériens et eucaryotes.

1.3. Souche bactérienne

Le vecteur d'expression de *Gasp-2* a été cloné puis amplifié dans la souche *Escherichia coli K-12*, TOP10, de génotype F– *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (StrR) *end*A1 *nup*G.

1.4. Anticorps

Les anticorps utilisés sont listés dans le ***tableau 3*** ci-dessous :

Anticorps primaires	Espèce	Utilisation	Fournisseur	Dilution
Ac anti-laminine	lapin	immunohistochimie	Sigma	1/500
Ac anti-myosine Type I (BA-D5)	souris	immunohistochimie	DSHB	1/2
Ac anti-myosine Type IIa (SC-71)	souris	immunohistochimie	DSHB	1/2
Ac anti-myosine Type IIb (BF-F3)	souris	immunohistochimie	DSHB	1/2
Ac anti-myosine Type I, IIx, IIb (8H2)	souris	immunohistochimie	DSHB	1/2
Ac anti Gasp2	souris	ELISA	RD system	1/180
Ac anti - GRP78	lapin	western blot	Abcam	1/2000
Ac anti GAPDH	chèvre	western blot	RD system	1/2000
Ac anti Gasp1	lapin	western blot	Sigma	1/800

Anticorps secondaires	Espèce	Couplage	Fournisseur	Dilution
Ac anti-lapin	chèvre	Alexa Fluor® 546	Thermofisher	1/1000
Ac anti-souris (IgG)	chèvre	Alexa Fluor® 488	Thermofisher	1/1000
Ac anti-souris (IgM)	chèvre	Alexa Fluor® 488	Thermofisher	1/1000
Ac anti-Gasp2	souris	HRP	RD system	1/180
Ac anti-lapin	chèvre	HRP	Sigma	1/2000
Ac anti-chèvre	lapin	HRP	Dako	1/2000

Tableau 3 : liste des anticorps utilisés.

2. Biologie Moléculaire

2.1. Extraction d'ADN/ARN - PCR

2.1.1. Extraction d'ADN génomique à partir de queue de souris / tissus

Un morceau de 0,5 cm de queue de souris ou de tissu est prélevé et incubé à 56°C sur la nuit dans du tampon d'extraction (50mM Tris-HCl pH8, 100mM EDTA pH8, 100mM NaCl, 1% SDS (p/v)) contenant 5mg/ml de protéinase K. Le lendemain, les lysats cellulaires sont mixés et sont incubés avec du NaCl 6M (v/v = 1/3). Les débris cellulaires et les protéines précipitées sont éliminés par centrifugation 10 minutes à 13 000 rpm. À partir du surnageant, l'ADN génomique est précipité à l'isopropanol (v/v = 2/3). Le culot d'ADN obtenu est rincé à l'éthanol 70% par centrifugation pendant 5 minutes avant d'être repris dans du TE (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA pH8). Les échantillons d'ADN sont dosés au nanodrop (Agilent).

2.1.2. Extraction d'ADN génomique à partir de sang

À partir d'un échantillon de sang prélevé sur EDTA, l'ADN est extrait à l'aide du kit Qiagen « Dneasy® Blood & Tissue » selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 50 à 100 µl de sang sont incubés avec de la protéinase K à 56°C. L'ADN est précipité à l'éthanol 100% et purifié sur membrane de silice. L'ADN est ensuite élué avant d'être dosé.

2.1.3. Extraction d'ADN plasmidique

Une colonie bactérienne isolée est inoculée dans du milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Après une nuit à 37 °C sous agitation à 200 rpm, une partie de la culture est congelée à -80°C dans 15% glycérol, le reste est centrifugé. Le culot est repris dans un tampon de re-suspension froid (50 mM Glucose, 25 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA). Un volume équivalent de solution de lyse (0,2 N NaOH-1% SDS) est ajouté. La précipitation des protéines et de l'ADN bactérien se fait par ajout du tampon de neutralisation (3 M KOAc, pH 6.0). Après centrifugation, le surnageant est transféré et l'ADN plasmidique est précipité à l'éthanol absolu froid (v/v = 2) puis lavé dans de l'éthanol 70% avant d'être repris dans du TE pH = 8.

2.1.4. Extraction d'ARN à partir de tissus

L'extraction est réalisée à partir de tissus congelés dans de l'azote liquide juste après le prélèvement. Chaque tissu est broyé au mortier dans de l'azote liquide jusqu'à l'obtention de poudre. Pour chaque échantillon, 30 mg de tissus sont resuspendus dans 0,5 ml de TRIzol® puis incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Après l'ajout de 100 µl de chloroforme et une agitation par inversion, la solution est incubée 3 minutes à température ambiante puis centrifugée à 12 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Après centrifugation, deux phases sont obtenues. Après avoir récupéré la phase aqueuse, les ARN sont précipités par ajout de 500 µl d'isopropanol suivi d'une incubation 10 minutes à température ambiante. Après une centrifugation de 15 minutes à 12 000 rpm à 4°C, le surnageant est éliminé puis le culot est lavé avec 0,5 ml d'éthanol 75% pendant 1 minute à 12 000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot est séché à température ambiante. L'ARN est repris dans 35 µl d'eau Rnase-free avant d'être incubé 10 minutes à 55-60°C et congeler à -80°C. 5 µl d'ARN sont aliquotés pour un dosage au nanodrop et un test de la qualité des ARN sur gel ou puce agilent.

2.1.5. Contrôle qualité des ARN

La qualité des ARN est mesurée avec la puce Agilent® RNA 6000 Nano sur le Bioanalyseur 2100 (Agilent Biotechnologies, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Cette analyse est une méthode standard pour le contrôle qualité des échantillons d'ARN et remplace dans ce domaine l'électrophorèse sur gel. En effet, cet analyseur permet de quantifier la qualité des échantillons d'ARN en leur associant une valeur numérique appelée RNA Integration Number (RIN). Le RIN peut aller de 0 à 10 : 0 correspondant à de l'ARN très dégradé et 10 correspondant à de l'ARN intact.

2.1.6. Rétrotranscription

La rétrotranscription des ARN en ADNc est réalisée avec le kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » selon le protocole fourni avec le kit et selon ce cycle : 10 minutes à 25°C, 120 minutes à 37°C, 5 minutes à 85°C. Typiquement, ce kit permet de rétrotranscire jusqu'à 2 µg d'ARN en utilisant comme amorces de courtes séquences oligonucléotidiques synthétisées de façon aléatoire et comprenant 6 nucléotides.

2.1.7. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Pour une réaction de 25 µl, la PCR s'effectue dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 10 ng d'ADN, 0,2 µM de chaque amorce, 0,2 mM de dNTPs, 1 unité enzymatique (UptiTherm DNA polymérase, Interchim) dans du tampon contenant 2 mM de $MgCl_2$. La PCR comprend une dénaturation initiale de l'ADN de 5 minutes à 94°C, 35 cycles comprenant une phase de dénaturation de 30 secondes à 94°C, une phase d'hybridation de 30 secondes à une température (Tm) dépendante des amorces utilisées (***tableau 5***) et une phase d'élongation de 1 minute/kb à 72°C, et à la fin des 35 cycles, une élongation finale de 5 minute à 72°C.

2.2. Ligature en vecteur TOPO®

Cette ligature est réalisée en suivant les recommandations fournies dans le kit TOPO® de ThermoFisher.

2.3. Transformation

Les boîtes de cultures sont préparées à l'avance et contiennent du milieu LB Agar et de l'ampicilline (100 µg/ml de LB). Pour réaliser la transformation des bactéries compétentes TOP10, 2 µl de produit de ligature (produit PCR + plasmide) sont ajoutés à 50 µl de bactéries avant une incubation de 10 minutes dans la glace. Cette étape est suivie d'un choc thermique de 30 secondes à 42°C et d'une incubation quelques minutes dans la glace.

Par la suite, 250 µl de milieu SOC sont ajoutés aux bactéries. Les bactéries sont alors placées sous agitation horizontale pendant 1 heure à 37°C avant d'être étalées en totalité sur une boîte LB contenant de l'ampicilline. Les bactéries sont mises à incuber durant toute la nuit à 37°C. Le lendemain, plusieurs clones sont repiqués et la présence de l'insert est vérifiée par PCR. Les clones sélectionnés sont mis en culture dans 50 ml de LB liquide avec de l'ampicilline à 100 µg/ml. Ils sont ensuite incubés durant toute la nuit à 37°C sous agitation horizontale. Enfin une miniprep est réalisée sur le tube de culture et une mise en souchier d'un clone est réalisée (600 µl de glycérol + 1200 µl de culture bactérienne).

2.4. Réaction de séquençage

Le kit 3100 BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing contient les tampons et mix de séquençage prêts à emploi. Pour la réaction de séquençage, il faut ajouter, dans 5 µl de tampon et mix de séquençage, 1 µl d'une amorce à 10 pmol/µl par tube et 200 à 400 ng de plasmide, pour un volume final de 20 µl. L'insert est séquencé en sens et antisens avec les amorces suivantes :

Promoteur T7 : 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

BCH reverse : 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

Gasp-2-564 fw : 5'-CCACCTGCCCTGTACAACAGC-3'

Gasp-21145 rev : 5'-CTGTAGGCCCAGCGTGGCTC-3'

Les amorces Promoteur T7 et BCH reverse correspondent à des séquences situées sur le plasmide de part et d'autre de l'insert. La réaction d'amplification de séquences s'effectue durant 25 cycles contenant les étapes suivantes: 96°C pendant 10 secondes ; 55°C pendant 5 secondes et 60°C pendant 4 minutes.

2.5. Purification de séquence

Les séquences amplifiées ont été purifiées par chromatographie d'exclusion sur colonne de Séphadex™ G-50 (Sigma). Les colonnes sont réalisées à partir de 400 µl de séphadex lors

d'une centrifugation 3 minutes à 2500 rpm. Le produit de séquence est déposé au centre de la colonne puis centrifugé. Après une étape d'évaporation de 10 minutes à 94°C, la séquence purifiée est reprise dans 10 µl de formamide en vue du séquençage sur le séquenceur Abi 3130 d'Applied Biosystem.

2.6. PCR quantitative en temps réel

2.6.1. Méthodologie SybrGreen

Les réactions de PCRq ont lieu dans 17,5 µl final comprenant 8.75µL SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems), 5,25 pmol de chacune des amorces et 25 à 50ng d'ADNc ou ADN. Le SybrGreen, fluorochrome, s'intègre aux brins d'ADN lors de la PCR et libère de la fluorescence verte, à 520 nm, quantifiée à l'aide d'un QuantStudio ™3 (Applied Biosystems) au cours de l'amplification. Après 10 minutes à 95°C, l'analyse se fait durant 40 cycles comprenant 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C suivie d'une courbe de dissociation de 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C et 1 minute à 95°C. L'analyse du nombre de copies se fait par la méthode ΔΔCt en utilisant un gène rapporteur. Le choix des amorces est une étape critique dont le protocole utilisé est décrit ci-dessous.

<u>Design des amorces SybrGreen</u>

Les numéros GI des séquences des transcrits à amplifier ont été récupérés grâce à l'onglet Nucléotide de Pubmed (**http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/**) avec les mots-clés « (X) AND "Mus musculus"[porgn:__txid10090] ». "X" représente le gène dont nous cherchons à mesurer l'expression et "Mus musculus"[porgn:__txid10090]" représente l'espèce.

Les paires d'amorces ont été conçues grâce au site PrimerBlast (**http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/**). Ce site permet de concevoir les amorces en utilisant les sites Primer3 et Blast. Il donne la possibilité de concevoir des amorces directement à partir des séquences FASTA ou de l'identifiant GI. Plusieurs paramètres peuvent être spécifiés afin de potentiellement concevoir les paires d'amorces les plus efficaces :

- La taille du produit PCR (c'est un paramètre important, pour la PCRq SybrGreen, la taille recommandée des fragments à amplifier doit être comprise entre 100 et 200 pb).
- Le Tm des amorces qui doit être similaire afin que les amorces sens et antisens s'hybrident à une température commune.
- L'inclusion d'intron qui impose au logiciel de choisir les amorces de telle façon qu'un intron soit encadré par ces amorces. Ainsi si l'échantillon d'ADNc est contaminé par de l'ADN

génomique), alors ce dernier ne pourra pas être amplifié dans le temps d'élongation choisi. En effet, la présence de l'intron rendra cette séquence beaucoup trop grande.
- La vérification de la spécificité des amorces qui donne la possibilité de choisir la base de données et l'organisme qui doivent être utilisés pour vérifier la spécificité des amorces.
- La possibilité de permettre aux amorces d'amplifier différents variants d'épissage du gène à étudier.

Le site Oligocalc (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html) permet de vérifier que les amorces ne feront pas de structure secondaire. Ces structures secondaires sont de différents types : la formation d'épingle à cheveux qui se produit quand une partie de l'amorce est complémentaire d'une autre partie, l'auto-complémentarité qui se produit lorsque l'amorce est complémentaire avec elle-même, formant ainsi des homo-dimères d'amorces et la complémentarité avec l'autre amorce qui mène à des hétéro-dimères d'amorces.

Tests d'efficacité

La dernière étape dans le choix des amorces SybrGreen est la vérification des amorces par PCR et PCRq. La PCR permet de vérifier que l'amplicon est à la taille attendue et qu'il n'y a pas d'amplification aspécifique. La PCRq, quant à elle, permet de vérifier plusieurs paramètres :

- la présence ou l'absence d'amplifications aspécifiques
- la formation de dimères d'amorces
- l'efficacité des amorces.

La courbe de fusion va permettre de visualiser les amplifications aspécifiques ou la présence de dimères d'amorces. En effet, chaque produit d'amplification est caractérisé par son Tm (température pour laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié). Le Tm d'un produit d'amplification est mesuré en suivant l'évolution de la fluorescence lorsque la température augmente. Cette évolution se traduit par une courbe régressive. En dérivant cette courbe, une courbe caractérisée par la présence d'un (dans le cas où il n'y a pas d'amplification aspécifique) ou plusieurs pics (dans le cas où il y a des amplifications aspécifiques) est obtenue. L'abscisse du sommet du pic correspond au Tm d'un produit d'amplification. Le test d'efficacité des amorces consiste à tester des dilutions sériées du même échantillon d'ADNc (chaque dilution étant au $1/10^{ème}$). L'obtention des Ct de chacune des dilutions permet de tracer une droite de régression dont la pente de la courbe permet de calculer l'efficacité des amorces. La pente de la courbe doit être proche de -3,32 pour une efficacité de 100%.

	Amorces		Taille	Efficacité
ADNc de *Gasp-2*	F	FGASP2-A : 5'-ATG CGC CCT GAC CAA ATG TA-3' (Tm 60,03)	176 pb	74,17%
	R	RGASP2A : 5'-CTG TCC TGA GTA GTT GCC CG-3' (Tm 60,11)		
CMV	F	PCMVf1 : 5'-CCC ACT TGG CAG TAC ATC AA-3' (Tm 57,80)		90,60%
	R	PCMVr1 : 5'-GCC AAG TAG GAA AGT CCC AT-3' (Tm 57,19)		
CCR5	F	CCR5-L1 : 5'-GCA CAA AGA GAC TTG AGG CA -3' (Tm 58,40)	81 pb	80,47%
	R	CCR5-R1 : 5'-GTC ATC TCT AGG CCA CAG CA-3' (Tm 59,17)		
Fabp4	F	Fabp4F : 5'-CTT CAA ACT GGG CGT GGA A-3' (Tm 58,29)	182 pb	91,11%
	R	Fabp4R : 5'-AAG TCA CGC CTT TCA TAA CAC-3' (Tm 56,83)		
Myh1	F	Myh1F : 5'-CGC TCG AAG TTG CAT CCC TAA-3' (Tm 60,74)	151 pb	102,00%
	R	Myh1R : 5'-TGT TCT GAG CCT CGA TTC GC-3' (Tm 60,46)		
Emcn	F	EmcnF : 5'-ATG GAA CAC CTC CCG AAG GA-3' (Tm 60,65)	199 pb	104,00%
	R	EmcnR : 5'-TGG GAA CCT GGT AGC GTT GA-3' (Tm 61,12)		
Mfap5	F	Mfap5F : 5'-ACC TTC CAC AGA TGA CCT AGC-3' (Tm 59,17)	280 pb	92,36%
	R	Mfap5R : 5'-ACA GGG AGG TCG GAA GT-3' (Tm 56,47)		
Myh7	F	Myh7F : 5'-TCC TGC TGT TTC CTT ACT TGC TA-3' (Tm 59,67)	101 pb	102,00%
	R	Myh7R : 5'-TGA TAG AGA GGT AAG CCC AGG-3' (Tm 58,04)		
Couple 1, coté Côté 5' du transgène	F	5'-ACC CAA GCT AGT TAA GC-3'(Tm 58°C)	150 pb	
	R	5'- CTG GCA GCA GGT TGG TCT-3' (Tm 58°C)		
Couple 2, Côté 5' du transgène,	F	5'- GGA GAC CCA AGC TGG CTA GT-3' (Tm 58°C)	130 pb	
	R	5'- CAG ATG GAT GAG CAC GAA GA-3'(Tm 58°C)		
Couple A, Côté 3' du transgène	F	5'- GCGAGAAGCGAGTCAAGAAG-3' (Tm 58°C)	110pb	
	R	5'- CCACTGGTGCTGGATATCTG-3' (Tm 58°C)		
Couple B, Côté 3' du transgène	F	5'- GTGGAACTGCTCGAGAAGAAG-3' (Tm 58°C)	150pb	
	R	5'- AGACCGAGGAGAGGGTTAGG-3' (Tm 58°C)		

Tableau 4 : Les différentes amorces utilisées.

2.6.2. PCR quantitative Taqman ***(figure 15)***

Le niveau d'expression des gènes d'intérêt est analysé en utilisant la technologie TaqMan® à l'aide du QuantStudio™ 3 (Applied Biosystems) et les sondes spécifiques pour chaque gène *Gasp-2* (Mm01308311_m1), *Gasp-1* (Mm01308311_m1) et *Mstn* (Mm03024050_m1). La réaction se fait dans un volume final de 17,5µl à partir de 5 ng d'ADNc avec le kit TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) et selon les recommandations du fournisseur. L'analyse s'effectue sur 40 cycles selon le même programme que pour la méthodologie SybrGreen. Plusieurs gènes de référence sont utilisés : *Dffa* (Mm00438410_m1), *Gapdh* (Mm99999915_g1) et *β2m* (Mm00437762_m1). Les résultats obtenus sont analysés avec le logiciel QuantStudio™ Design & Analysis Software (Applied Biosystems), à l'aide de la méthode des RQ.

2.7. Test ELISA

La mesure de la quantité de protéines GASP-2 dans le sérum de souris appartenant aux différentes lignées TgGasp-2 a été réalisée par ELISA avec le kit DuoSet Ancillary Reagent Kit 2 (R&D Systems) selon les recommandations du fournisseur.

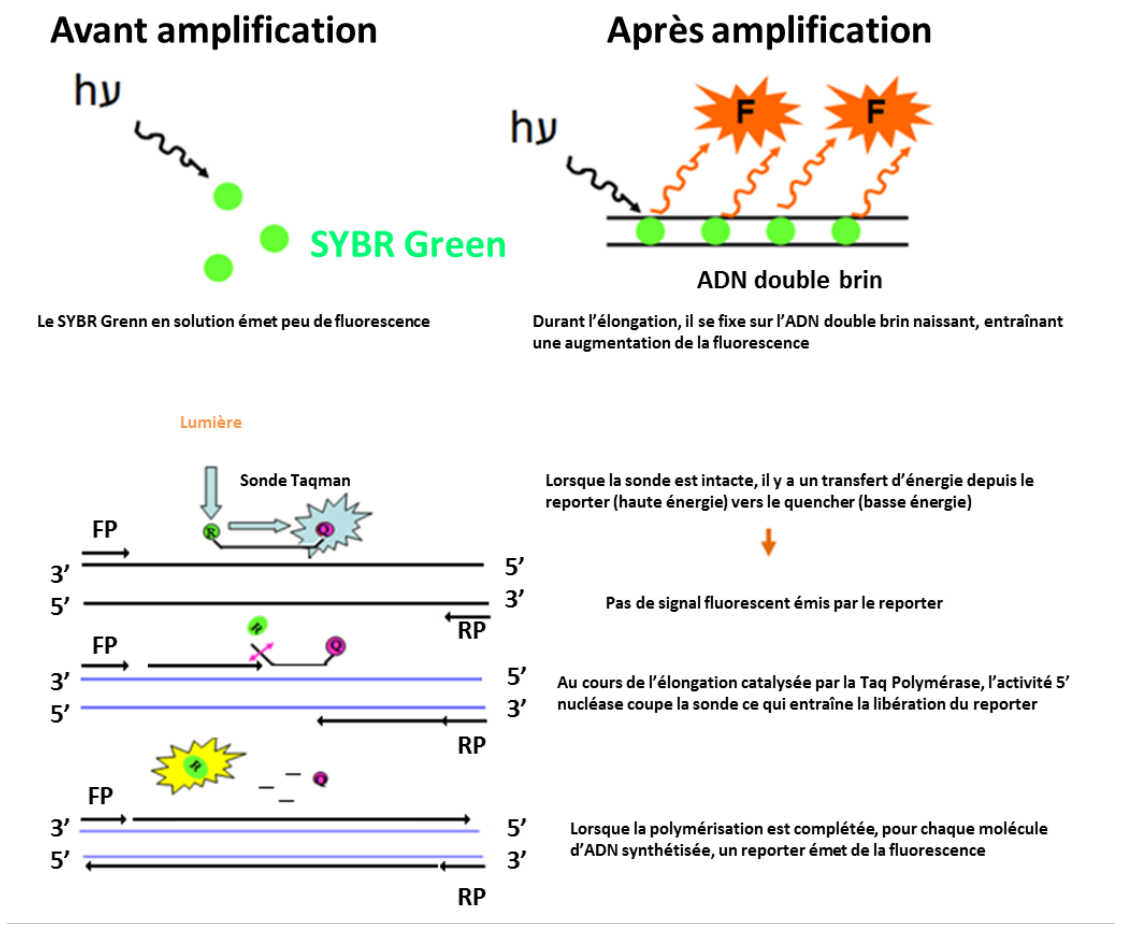


Figure 15 : Différences entre la qPCR SybrGreen et la qPCR Taqman

La différence principale entre la technologie SybrGreen et la technologie Taqman a lieu au niveau de la génération de la fluorescence. Ainsi dans le cas de la technologie SybrGreen, la fluorescence est émise lorsque l'agent intercalant SybrGreen se fixe sur l'ADN double brin au niveau du petit sillon (ce n'est donc pas un agent intercalant comme le BET et est donc nettement moins toxique). Dans le cas de la technologie Taqman, la fluorescence est émise lorsqu'une sonde complémentaire à une partie de la séquence à amplifier est hydrolysée par l'activité 5' nucléase de la Taq Polymérase. Les avantages de la technologie SybrGreen sont le prix des amorces, la facilité d'utilisation, le fait que des mutations de l'ADN cible (en dehors des séquences reconnues par les amorces) n'affectent pas l'amplification. Les inconvénients de la technologie SybrGreen sont le fait que la spécificité repose entièrement sur les amorces (d'où la nécessité de tester les amorces) et des problèmes de surestimation de la quantification (le SybrGreen se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin y compris des produits non spécifiques comme les dimères d'amorces). Les avantages de la technologie Taqman sont la spécificité des amorces et la spécificité de l'hybridation de la sonde Taqman ainsi que la possibilité de multiplexage (l'amplification de séquences différentes dans le même puits) avec des sondes portant des fluorochromes différents. Les inconvénients de la technologie Taqman sont le coût des amorces qui rend difficile une quantification de l'expression sur de nombreux gènes.

(D'après S Pereyre, Hôpital Pellegrin)

2.8. Mesure des activités enzymatiques du muscle squelettique par spectrophotométrie

La mesure des activités enzymatiques se réalise à partir d'un homogénat de muscle à 5% (p/v) dans un tampon pH 8.0 (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Tris). Le muscle congelé est broyé dans le tampon dans la glace avec un ultra-turax. Après une centrifugation à 6000 rpm pendant 15 min à 4°C, les surnageants sont prélevés et stockés dans la glace jusqu'à la mesure des activités enzymatiques de la lactate déshydrogénase (LDH) et de l'isocitrate déshydrogénase (ICDH) par l'automate Konelab 30 (Thermo Scientific).

La LDH caractérise le métabolisme anaérobie, tandis L'ICDH, enzyme du cycle de KREBS, caractérise le métabolisme aérobie. Ces deux enzymes catalysent les réactions suivantes :

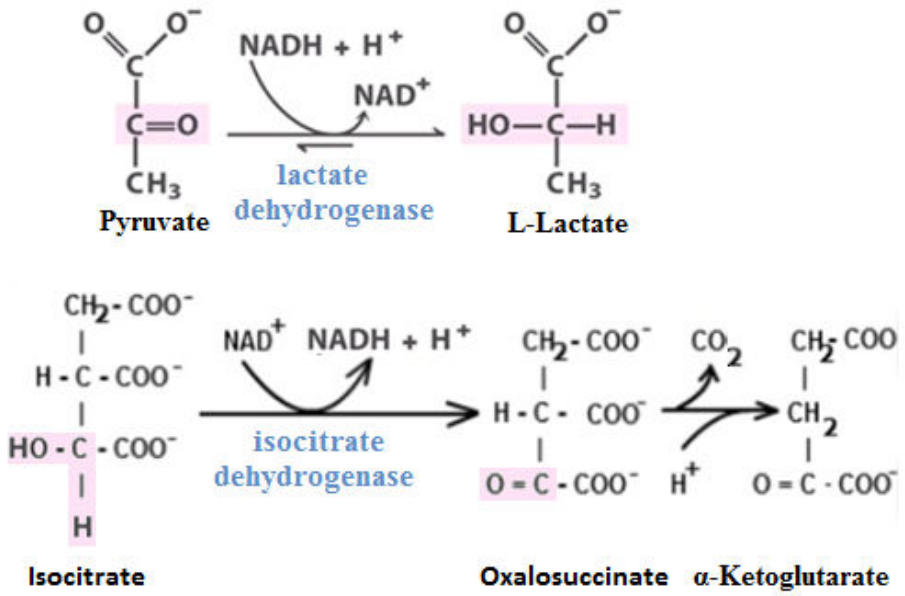


Figure 16 : Les réactions catalysées par les enzymes LDH et ICDH

L'activité de l'enzyme LDH (lactate dehydrogenase) est détectable en mesurant la disparition du NADH à 340 nm par unité de temps.

L'activité de l'enzyme ICDH (isocitrate dehydrogenase) est détectable en mesurant la formation du NADH à 340 nm par unité de temps.

Le dosage de l'activité de la LDH et de l'ICDH est basé sur la mesure à 340 nm de la disparition du NADH (cas de la LDH) ou de sa formation (cas de l'ICDH) par unité de temps. Cette valeur est proportionnelle à l'activité des enzymes et permet leur détermination selon la formule suivante : Activité Enzymatique = $(\Delta DO/min * V_C * Dil * V_H)/(\varepsilon * V_E * P_E)$ avec :

- $\Delta DO/min$: la variation de DO par minute.
- V_C : le volume de la cuve en ml.
- Dil : le facteur de dilution.
- V_H : le volume de l'homogénat en ml.
- ε : le coefficient d'extinction molaire 6,3 ml/µmol/cm.
- V_E : le volume de prise d'essai en ml.
- P_E : le poids de l'échantillon.

Le détail des dosages est présenté dans ***l'annexe 1***.

2.9. Analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle

2.9.1. Extraction des protéines totales

La méthode d'extraction des protéines est basée sur une extraction des protéines totales. Le quadriceps entier (200-250 mg) est broyé dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier. Quatre quadriceps issus de quatre animaux différents de la lignée TgGasp-1.20 et de la lignée FVB sont prélevés, puis congelés directement dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

100 mg de poudre de muscle sont ensuite pesés et solubilisés dans 10 volumes de tampon urée 8 M, de thiourée 2 M, de CHAPS 4%, de DTT 0.5 mM, d'EDTA 250mM complémenté avec un cocktail inhibiteur de protéases. Les extraits sont vortexés une dizaine de secondes. La solubilisation des protéines est finalisée par deux cycles de sonication dans la glace (10 seconde à 10% d'amplitude). Après une centrifugation de 15 minute/10000g/4°C visant à éliminer le matériel insoluble, le surnageant est précipité à l'aide du kit 2D-Clean Up (GE Healthcare, Suède) selon les recommandations du fabricant.

Les culots protéiques obtenus sont alors solubilisés dans un tampon urée 8 M, thiourée 2 M, et CHAPS 4%, puis dosés au niveau protéique en triplicat à l'aide du kit 2D-Quant (GE Healthcare, Suède) selon la procédure standard recommandée par le fabricant. Les extraits protéiques sont aliquotés puis conservés à -80°C.

La qualité des extraits est ensuite visualisée sur un gel SDS-PAGE. 20 µg de protéines dénaturées à l'aide d'un Tampon de charge 5X (10% SDS p/v, 50% glycérol v/v, 300mM Tris pH 6.8, 0.5M DTT) sont déposées sur un gel 10% SDS-PAGE (10*10.5cm) à l'aide du système VE 260 Hoefer de chez Amersham Biosciences. La migration est réalisée dans un tampon de migration (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS (v/v)) à 4°C pendant 1h30 à ampérage constant (20µA/gel). Le gel est ensuite coloré au bleu colloïdal (voir chapitre 2.9.4. Coloration des gels au bleu colloïdal (G-250).

2.9.2. Première dimension : Isoélectrofocalisation

Réhydratation des bandes d'IPG Buffer Strip

L'étape de focalisation isoélectrique des protéines est réalisée sur des bandes d'IPG (Immobilized pH gradient) de 18 cm avec un gradient de pH linéaire allant de 4 à 7 (Immobiline™ DryStrip pH 4-7, 7 cm, GE Healthcare, Suède). Les bandes sont réhydratées dans un Reswelling Tray (Ge Healthcare) pendant 12 heures à température ambiante dans 125 µL de tampon de réhydratation dont la composition est présentée dans le ***tableau 5***:

Constituants	Concentration finale
Urée	8 M
Thiourée	2 M
CHAPS	4% (p/v)
DTT	65 mM
IPG Buffer pH 4-7 (GE Healthcare, Suède)	1% (v/v)
Bleu de bromophénol	traces
H_2O MilliQ	q. s p.

Tableau 5 : Composition du tampon de réhydratation des bandes d'IPG

IEF (Isoélectrofocalisation)

Du DTT et de l'IPG Buffer sont additionnés aux extraits protéiques pour obtenir les mêmes concentrations que la solution de réhydratation. Les échantillons (700 µg/gel) sont ensuite déposés sur les bandes dans les cupules de dépôt (Cup loading, GE Healthcare) placées du côté anode. L'IEF est réalisée à 20°C sur un système IPGphor (GE Healthcare, Suède). 75 µA sont appliqués à chaque gel selon les étapes décrites (***figure 17***).

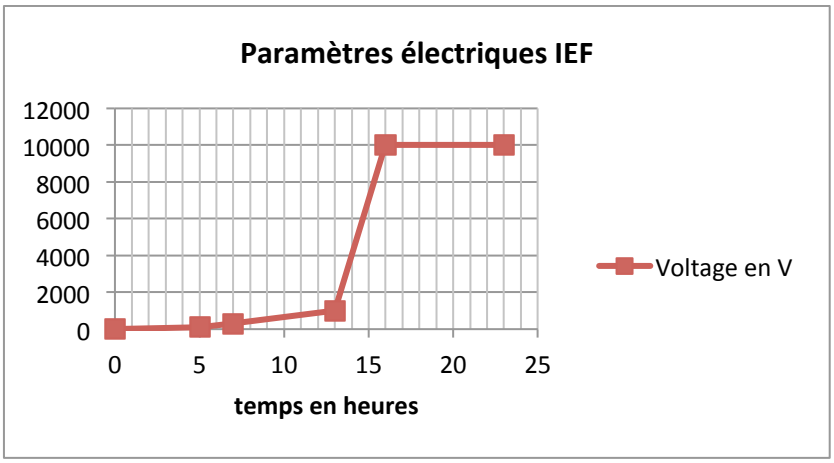


Figure 17: Gradient de voltage au cours de l'étape d'IEF

Un gradient de voltage permet une séparation précise des protéines selon leur pHi.

Après la focalisation des protéines soit 85 KVhs, les gels sont incubés 15 minutes dans une solution de réduction (Tris pH 8,8, SDS 2%, urée 6 M, glycérol 30%, et DTT 125 mM), suivi par 15 minutes dans une solution d'alkylation (Tris pH 8,8, SDS 2%, urée 6 M, glycérol 30%, iodoacétamide 125 mM, et des traces de bleu de Bromophénol). 3 réplicats techniques ont été effectués par échantillon biologique.

2.9.3. Deuxième dimension : SDS-PAGE

Les gels de première dimension sont déposés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide 10% (21*26cm) (voir composition ***tableau 6***). De l'agarose 1% (p/v) est coulé entre les deux plaques du gel de seconde dimension permettant de maintenir les deux gels en contact.
L'électrophorèse est alors réalisée sur un système de séparation vertical Dalt 6 chez Ge Healthcare équipé d'un générateur de type Electrophoresis Power Supply 1001 (GE Healthcare, Suède) et d'un cryothermostat.

Constituants du gel SDS-PAGE 1.5mm	Concentration
Acrylamide 40% (GE Healthcare, Suède)	10% (v/v)
Bisacrylamide 2% (GE Healthcare, Suède)	2,7% (v/v)
Tris 1.5 M pH 8,8	0.386 M
SDS 20%	0,1% (v/v)
APS 10%	0,05% (v/v)
Temed	0,1% (v/v)
H_2O MilliQ	q.s.p.

Tableau 6 : Composition du gel de polyacrylamide

La migration est réalisée dans un tampon de migration (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS (v/v)) à 4°C pendant 30 min à 5Watts/gel puis 4h30 à 17Watts/gel.

2.9.4. Coloration des gels au bleu colloïdal (G-250)

La révélation des protéines au bleu colloïdal nécessite quatre étapes successives. Les protéines sont tout d'abord fixées dans le gel en l'immergeant pendant 2 h minimum dans une solution d'éthanol à 30% (v/v) contenant 2% (v/v) d'acide orthophosphorique. Le gel est ensuite immergé dans deux bains successifs de 30 min d'acide orthophosphorique 2% (v/v). La coloration est réalisée dans une solution de sulfate d'ammonium 1,2 mM contenant 18 % (v/v) d'éthanol et 2% (v/v) d'acide orthophosphorique. Après 30 min, 1% (v/v) d'une solution de bleu colloïdal G-250 (Merck, Allemagne) à 0,5% (p/v) est additionnée à la solution de coloration. Le gel est coloré pendant 72 h sous agitation tridimensionnelle, à température ambiante. Les gels sont ensuite stockés dans une solution d'acide acétique 3% à 4°C. 3 réplicats techniques sont réalisés par réplicat biologique.

2.9.5. Analyse Informatique des cartes protéiques

Les gels sont scannés avec Image Scanner II (GE Healthcare) et les images sont analysées par le logiciel Progenesis Samespot de la société Non linear Dynamics. Les images 2D issues du protéome musculaire de la lignée TgGasp-1.20 sont comparées avec celles issues de la lignée FVB. Les données sont exprimées en ratio correspondant au volume (intensité X surface) d'un spot protéique issu de la carte protéique TgGasp-1.20 sur le volume du même spot issu de la carte protéique FVB.

Les variants protéiques sont validés après un t-test avec $p < 0,05$, une puissance supérieure à 70% et un ratio supérieur à ±1.2 fois.

2.9.6. Digestion des protéines

Les spots protéiques sont excisés à partir des gels d'électrophorèse 2D colorés au bleu de Coomassie G-250. Les spots sont tout d'abord décolorés par lavage à l'eau milliQ puis déshydratés dans 50 µl d'ACN et réhydratés dans 50 µl de bicarbonate d'ammonium 100 mM pendant 15 minutes à 37°C. Une quantité équivalente d'ACN est ensuite ajoutée au mélange précédent et après une incubation de 15 minutes à 37°C, les spots sont séchés au speed vac. La trypsine est préparée à partir d'une solution stock à 0.1µg/µl diluée dans du bicarbonate

d'ammonium 25 mM pour une concentration finale de 10 ng/µl. Les spots déshydratés sont incubés avec 25 µl de trypsine à 10 ng/µl (soit 250 ng par spot) toute la nuit à 37°C. Les surnageants sont récupérés dans un microtube 0,5 ml et les peptides résultant de la digestion trypsique sont successivement extraits par 50 µl d'ACN 40%-FA 1 %, 10 µl d'ACN 25%-FA 1% et 25 µl d'ACN 60%. Tous les surnageants sont alors rassemblés et évaporés à sec au speed vac.

2.9.7. Analyse par spectrométrie de masse

Après la digestion trypsique, les peptides sont resolubilisés dans 7 µl de solvant du module Switchos (ACN 2%, TFA 0.05%) pour l'analyse par nano-LC MS/MS, composé d'un système de nano-chromatographie liquide LC Packings (Dionex, Amsterdam, Pays-Bas) couplé à un spectromètre de masse QTRAP (Applied Biosystems). Pour chaque échantillon, 5 µl sont injectés dans une pré-colonne (C18 PepmapTM 300µm ID x 5mm) avec un débit de 30 µl/min de solvant du module Switchos. Après une étape de dessalage de 3 minutes, la pré-colonne est couplée à la colonne analytique (C18 PepmapTM 75µm ID x 150mm) équilibrée préalablement avec 100% de solvant A (ACN 2%, FA 0.1%). Les peptides sont élués de la pré-colonne vers la colonne analytique et ensuite vers le spectromètre de masse grâce à un gradient linéaire de 0% à 50% de solvant B (ACN 90%, FA 0.1%) pendant 65 minutes à un débit de 300 nl/min.

L'acquisition des données est réalisée selon la méthode IDA (Information-Dependant Acquisition) du logiciel Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems). Les données de MS et MS/MS sont enregistrées de façon continue avec une durée de cycle de 3 secondes. Pour chaque scan MS, deux précurseurs sont sélectionnés pour la fragmentation, sur la base de leur intensité (supérieure à 20 000 cps), de leur état de charge (2+, 3+), et si ce précurseur a déjà été sélectionné précédemment pour la fragmentation (exclusion dynamique). Les énergies de collision sont ajustées automatiquement en fonction de l'état de charge et de la masse des ions précurseurs sélectionnés.

2.9.8. Recherche dans les bases de données

Pour l'identification des protéines, les résultats de l'analyse par nano-LC MS/MS sont utilisés pour interroger la banque de données Swiss Prot par le logiciel Mascot (version 2.2, Matrix Science, Angleterre) avec les critères suivants : l'espèce Mus musculus, 0.5 Da de tolérance pour la masse des peptides et des fragments peptidiques, un seul site de clivage manqué lors de la digestion par la trypsine, et enfin la carbamidométhylation des résidus cystéine (due à

l'alkylation des groupements –SH par l'iodoacétamide) et l'oxydation de la méthionine comme modifications variables. L'identification des protéines est validée si au moins 2 peptides ont un score supérieur à 25, ou un peptide de score supérieur à 50 avec un taux de confiance au moins égal à 95%.

2.10. Western Blot

20 µg de protéines totales dénaturées à l'aide d'un Tampon de charge 5X (10% SDS p/v, 50% glycérol v/v, 300mM Tris pH 6.8, 0.5M DTT) sont déposées sur un gel 10% SDS-PAGE (10*10.5cm). La migration est réalisée dans un tampon de migration (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS (v/v)) à 4°C pendant 1h30 à ampérage constant (20 µA/gel). Le gel est ensuite équilibré 10 minutes dans du tampon de transfert (192 mM Glycine, 25 mM Tris, 0.1% SDS (v/v), 20% méthanol (v/v). Il est ensuite transféré pendant 45 minutes sur une membrane de nitrocellulose ECL 0.2 µm à l'aide de l'appareil à transfert TE70PWR (Ge Healthcare) en appliquant 0.8mA/cm2.

La membrane est saturée dans du lait 5% TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) pendant 1h30 minimum sous agitation à température ambiante et rincée avec 3 bains de tampon TBS.

Immunorévélation de la protéine GASP-1

2 ng de protéine humaine GASP-1 recombinante (RD System) sont déposés comme contrôle positif des anticorps. Les anticorps primaires anti-GASP-1 (Rabbit, Sigma) dilué au 1/800ième dans du lait 1% TBS sont incubés avec la membrane pendant 1 nuit à 4°C sous agitation tridimensionnelle. Après 3 rinçages TBS de 10 minutes, les anticorps secondaires anti-rabbit couplés à la Horse Radish Peroxydase (Goat, Sigma) dilué au 1/2000ième dans du lait 1% TBS sont incubés avec la membrane 2h à température ambiante sous agitation tridimensionnelle.

Immunorévélation de la protéine GRP78

La membrane est découpée en 2 parties, la partie supérieure pour la révélation de la protéine GRP78 et la partie inférieure pour la protéine de référence GAPDH.

Les anticorps primaires GRP78 (Rabbit Polyclonal, Abcam) et GAPDH (Goat Polyclonal, RD system) sont dilués au 1/2000ième dans du tampon Lait 1% TBS et incubés avec la membrane à 4 °C pendant 1 nuit sous agitation tridimensionnelle. La membrane est ensuite rincée 3 fois avec du tampon TBS et incubée 1h à température sous agitation tridimensionnelle avec les anticorps secondaires anti-rabbit et anti-goat couplés à la Horseradish Peroxydase (Sigma) dilués au 1/2000ième dans du tampon lait 1% TBS.

Révélation

Après 3 lavages au TBS, les membranes sont révélées par le réactif Enhanced Chemiluminescent (Roche Diagnostic, CN 11500694001) permettant l'émission de lumière. Un film photographique (Amersham Hyperfilm ECL) est mis en contact puis plongé successivement dans une solution de révélation et de fixation. Le signal est alors imprimé de manière définitive sur le film.

3. Suivi poids/taille

Chaque semaine, les souris des lignées TgGasp-2 et de la lignée contrôle ont été pesées du jour du sevrage à 150 jours plus tard afin de déterminer des courbes de croissance.

4. Prélèvements d'échantillons biologiques

4.1. Prélèvement de sang sur animaux anesthésiés

Après avoir anesthésié les animaux dans une chambre d'induction par une anesthésie gazeuse à l'isoflurane (1,5% isoflurane, 3 l/min en air), le volume sang nécessaire est prélevé au niveau du sinus rétro-orbitaire sous héparine pour le plasma ou dans un tube sec pour le sérum. Le sang est laissé à 4°C sur la nuit pour une coagulation lente puis centrigé pour séparer le sérum.

4.2. Nécropsie

Après le sacrifice des animaux par dislocation cervicale ou euthanasie gazeuse par CO_2, les muscles (quadriceps, pectoraux, soleus, tibialis anterior, gastrocnémien) sont individualisés et pesés ainsi que les organes internes (pancréas, foie), les tissus adipeux (blanc et brun) et les organes reproducteurs.

Les tissus utilisés pour des analyses enzymatiques, des extractions d'ARN ou de protéines sont directement congelés à l'azote liquide. Pour une utilisation histologique, les tissus sont traités en fonction de leur utilisation ultérieure.

5. Histologie

5.1. Inclusion paraffine

Après avoir prélevé les tissus, ils sont fixés sur la nuit dans du formol avant d'être inclus en paraffine. Le cycle d'inclusion est réalisé à l'aide d'un automate Leica biosystems

(Automated Vacuum Tisue Processor ASP 6025) selon le programme décrit dans le ***tableau 7***. Les tissus sont ensuite inclus en cassette à l'aide de la platine HistoCore (Leica Biosystems).

Protocole d'inclusion en paraffine		
Etape	Réactif	Temps
1	Formol	1h
2	Ethanol 70%	40 min
3	Ethanol 80%	40 min
4	Ethanol 95%	40 min
5	Ethanol 100%	1h
6	Ethanol 100%	1h
7	Xylène	1h
8	Xylène	1h
9	Xylène	1h
10	Paraffine	1h
11	Paraffine	1h
12	Paraffine	1h30

Protocole de coloration HES		
Etape	Réactif	Temps
1	Xylène	5 min
2	Xylène	5 min
3	Ethanol 95%	3 min
4	Ethanol 95%	3 min
5	Eau	5 min
6	Hématéine	5 min
7	Eau	5 min
8	Carbonate de lithium	30 s
9	Eau	3 min
10	Eosine	3 min
11	Eau	2 min
12	Ethanol 95%	2 min
13	Ethanol 95%	1 min
14	Safran	2 min 30
15	Ethanol 95%	2 min 30
16	Ethanol 95%	2 min 30
17	Xylène	2 min
18	Xylène	1 min 30

Tableau 7 : Protocole d'inclusion en paraffine et protocole de coloration HES

Après l'inclusion en paraffine, des coupes de 4 µm sont effectuées à l'aide d'un microtome et collées sur lame avec du Stick On®. Les coupes sont conservées à température ambiante avant coloration.

5.2. Inclusion OCT

Certaines analyses histologiques nécessitent des coupes d'organes non déshydratés et non traitées. Après prélèvements, les tissus sont directement placés dans une solution d'OCT à -80°C pour être coupés au cryostat. L'OCT est une « colle », liquide et transparente à température ambiante et blanche et dure à partir de -20°C. C'est un cryoconservateur, qui préserve le tissu des congélations/décongélations intempestives, qui protège le tissu de tout contact, qui évite la formation de cristaux dans le tissu conservé à -80°C. Dans le cas du muscle squelettique, les tissus sont préalablement congelés dans une solution d'isopentane

refroidie à l'azote liquide dans une matrice d'OCT. Les tissus sont coupés à 10 µm à d'aide d'un cryostat et conservés à -80°C.

5.3. Coloration Hématoxyline-Eosine-Safran

La coloration Hématoxyline-Eosine-Safran est réalisée à l'aide de l'automate de coloration de lames Tissue-Tek® Prisma® selon le programme reporté dans le ***tableau 7***. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avant d'être observées au microscope.

5.4. Immunomarquage anti-laminine

Les lames cryostatiques, après être sorties du -80°C, sont séchées 30 minutes à température ambiante. Les tissus sont fixées dans du PFA 4% pendant 10 minutes à température ambiante sous la sorbonne. Les lames sont ensuite rincées trois fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X. Elles sont ensuite incubées pendant 1 heure avec la solution de saturation (Goat serum 10% ; BSA 1% ; Triton X-100 0,1% ; PBS 1X) pour empêcher un marquage aspécifique. Les lames sont rincées dans un bain de BSA 5%/PBS 1X puis séchées. Le contour des coupes est tracé avec un feutre hydrophobe (empêche le liquide de s'étaler hors de la coupe). L'anticorps primaire de lapin anti-laminine Sigma® L9393 est dilué au 500ème dans du PBS 1X puis déposé au centre de la coupe. Les lames sont incubées sur la nuit, à 4°C, dans l'obscurité et sous une atmosphère humide pour empêcher la dessiccation des coupes. Les lames sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS 1X puis incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor® 546 (Life Technology), qui est dilué au 1000ème dans du PBS 1X. L'incubation se fait pendant 15 minutes à 37°C à l'obscurité. Le surplus d'anticorps est éliminé par des lavages successifs au PBS 1X. Les coupes sont colorées avec une solution de DAPI diluée au 1000ème dans du PBS 1X pendant 5 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. Le DAPI est un fluorochrome capable de se lier fortement aux bases adénine et thymine de l'ADN et permettant ainsi de révéler les noyaux. Les lames sont ensuite rincées deux fois 5 minutes avec du PBS 1X pour éliminer l'excédent de DAPI. Enfin les lames sont montées avec une lamelle avec une solution de Montage (Mowiol®) et scellées à l'aide d'un vernis incolore. Les lames marquées sont conservées à l'abri de la lumière à 4°C pour éviter toute perte de fluorescence, jusqu'à leur observation au microscope à épifluorenscence (Leica® Microsystems DMI6000B).

5.5. Immunomarquage – typage des chaines lourdes de myosine

Les lames cryostatiques, après être sorties du -80°C, sont rincées rapidement dans du PBS 1X puis incubées pendant 10 minutes dans une solution de saturation (BSA 5%/PBS 1X). Les lames sont séchées et le contour des coupes est tracé avec un feutre hydrophobe. Les coupes sont ensuite incubées pendant 1h à 37°C dans une atmosphère humide avec les différentes solutions d'anticorps primaires de souris anti-myosine dilués au ½ (DSHB BA-D5 pour le Type I, SC-71 pour le Type IIa, BF-F3 pour le Type IIb et 8H2 pour les Type I, IIx et IIb). L'excédent d'anticorps est éliminé par 3 rinçages de 5 minutes au PBS1X. Les anticorps secondaires de chèvre anti-souris couplés au fluorochrome Alexa Fluor® 488 (IgG ou IgM en fonction des anticorps primaires utilisés,) sont dilués au 1000ème puis incubés à l'obscurité pendant 30 minutes à 37°C, sous atmosphère saturée en humidité. Les lames sont rincées 3 fois dans du PBS 1X pendant 5 minutes puis montées avec une lamelle avec la solution de Mowiol® et du vernis incolore.

5.6. Observation et acquisition des images

Les lames ont été observées au grossissement 10 à l'aide d'un microscope à épi-fluorescence Leica® Microsystems DMI6000B. Ce microscope permet de visualiser la fluorescence émanant des différents fluorochromes utilisés en utilisant les filtres adaptés à chaque fluorochrome utilisé (***tableau 8***).

L'acquisition des images est réalisée avec une caméra monochrome pilotée par le logiciel MetaMorph® Microscopy Automation & Image Analysis Software (Molecular Devices). Pour l'analyse de l'hypertrophie musculaire, 6 coupes sont analysées pour chaque individu. En fonction de la taille du muscle, 4 à 6 clichés sont réalisés pour chaque coupe (4 clichés pour le *soleus* et le *tibialis anterior* contre 6 pour le *gastrocnémien*). L'analyse de l'hyperplasie se fait également à partir de 6 coupes par individu mais l'intégralité de la coupe est considérée. Enfin, en ce qui concerne le typage des fibres, il est impératif de travailler avec quatre coupes sériées

Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission
Alexa Fluor® 488	495 nm	519 nm
Alexa Fluor® 546	556 nm	573 nm
DAPI	350 nm	470 nm

Tableau 8 : Les différents fluorochrome utilisés

5.7. Analyse des images

Analyse de l'hypertrophie

Les clichés ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ avec un programme semi-manuel. Cette analyse se fait de la façon suivante : Après l'ouverture de la photographie à analyser (File/Open), l'analyse se fait en plusieurs étapes :

- l'augmentation du contraste (Process/Enhance Contrast/Saturated Pixels : 10%),
- le seuillage de l'image (Threshold/MinError/Apply),
- le cloisonnement manuel des fibres musculaires (Pencil Tool/2 pixels de large),
- la mesure de l'aire des fibres musculaires (Analyse Particles/Size : 500-20 000/OK).

Les données sont ensuites sauvegardées et analysées.

Analyse de l'hyperplasie

Les clichés ont été analysés à l'aide du logiciel ImageJ. Un comptage manuel a été réalisé sur l'ensemble des coupes correspondant au soleus. Pour le tibialis anterior et le gastrocnémien, l'aire totale de la section musculaire a été divisée par la moyenne de l'aire des fibres.

Analyse du typage des fibres

Cette analyse utilise le logiciel Visilog (FEI). Pour chaque coupe, deux clichés sont nécessaires, un correspondant au marquage laminine, le second à un anticorps anti-myosine. Le marquage laminine permet d'identifier les fibres entre les différentes coupes. L'analyse des fibres se fait ensuite à partir de la combinaison de trois marquages anti-myosine: le marquage anti-myosine type I, IIx, IIb et enfin celui contre le type IIa. Chaque fibre est identifiée comme positive, négative ou intermédiaire pour chacun des trois marquages et ces résultats permettent de générer un codage pour chaque fibre qui permet ensuite d'identifier le typage de chacune des fibres analysées. Les données sont présentées en pourcentage pour chaque catégorie de fibres.

6. Analyse *in silico*

6.1. Traitement des données brutes

Les données brutes ont pu être analysées grâce à la plateforme d'analyse en ligne **GenePattern** (**http://genepattern.broadinstitute.org/**) développée par le Broad Institute aux USA et à ses nombreux modules bio-informatiques. Le module bio-informatique **ExpressionFileCreator** permet de transformer les fichiers CEL en entrée (dans notre cas,

neuf fichiers CEL pour neuf puces à ADN/conditions contenue dans un fichier ZIP) en un fichier unique RES en sortie. Un fichier RES correspond à une matrice de valeurs où chaque identifiant Affymetrix (correspondant à chaque sonde Affymetrix) est associé à une valeur d'intensité normalisée pour chaque condition. En effet, ce module permet de transformer les valeurs d'intensité des signaux obtenues pour chaque sonde Affymetrix (issues de la lecture de chaque spot par le scanner) en valeurs d'expression corrigées pour le bruit de fond et normalisées. L'algorithme RMA (Robust Multiarray Analysis) a été utilisé permettant une correction du bruit de fond et une normalisation par la méthode des quantiles.

Le module bio-informatique **CollapseDataset** permet d'associer à chaque sonde Affymetrix le gène correspondant. Pour fonctionner ce module a besoin de deux fichiers en entrée. Le 1er fichier correspond au fichier RES qui contient pour chaque identifiant Affymetrix les valeurs normalisées d'intensité. Le 2nd fichier correspond à la "plateforme de la puce", c'est-à-dire, un fichier spécifique du type de puce à ADN utilisée (ici MoGene_1_0_st.chip) qui associe à chaque identifiant Affymetrix, le gène correspondant.

Comme plusieurs identifiants Affymetrix peuvent correspondre à un même gène, ce module réduit les différentes valeurs associées à un gène à une seule valeur (la médiane) afin de faciliter l'analyse des données. Pour chaque temps de différenciation (0h, 12h et 24h), des ratios ont été calculés (mutant/sauvage) afin d'identifier les gènes sous- et sur-exprimés. Les gènes dont le ratio est inférieur à 0,7 (sous-expression) ou supérieur à 1,3 (sur-expression) ont été sélectionnés pour de plus amples analyses.

6.2. Analyse des données

Une analyse d'enrichissement en termes de Gene Ontology (GO) a été effectuée à partir des listes de gènes sous et sur-exprimés dans la condition mutante en comparaison de la condition sauvage pour chaque temps de différenciation à l'aide de l'outil WebGestalt (Web-based Gene Set Analysis Toolkit) (**http://www.webgestalt.org**).

Cet outil permet de réaliser des analyses d'enrichissement fonctionnel basés sur différents paramètres, comme les termes de GO (fonction moléculaire, processus biologique, compartiment cellulaire), l'appartenance à des voies de signalisation (KEGG, Pathways Commons, WikiPathways), les associations gènes/maladies, gènes/drogues (PharmKB), la localisation chromosomique...) (Zhang *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2013 ; ***figure 18***).

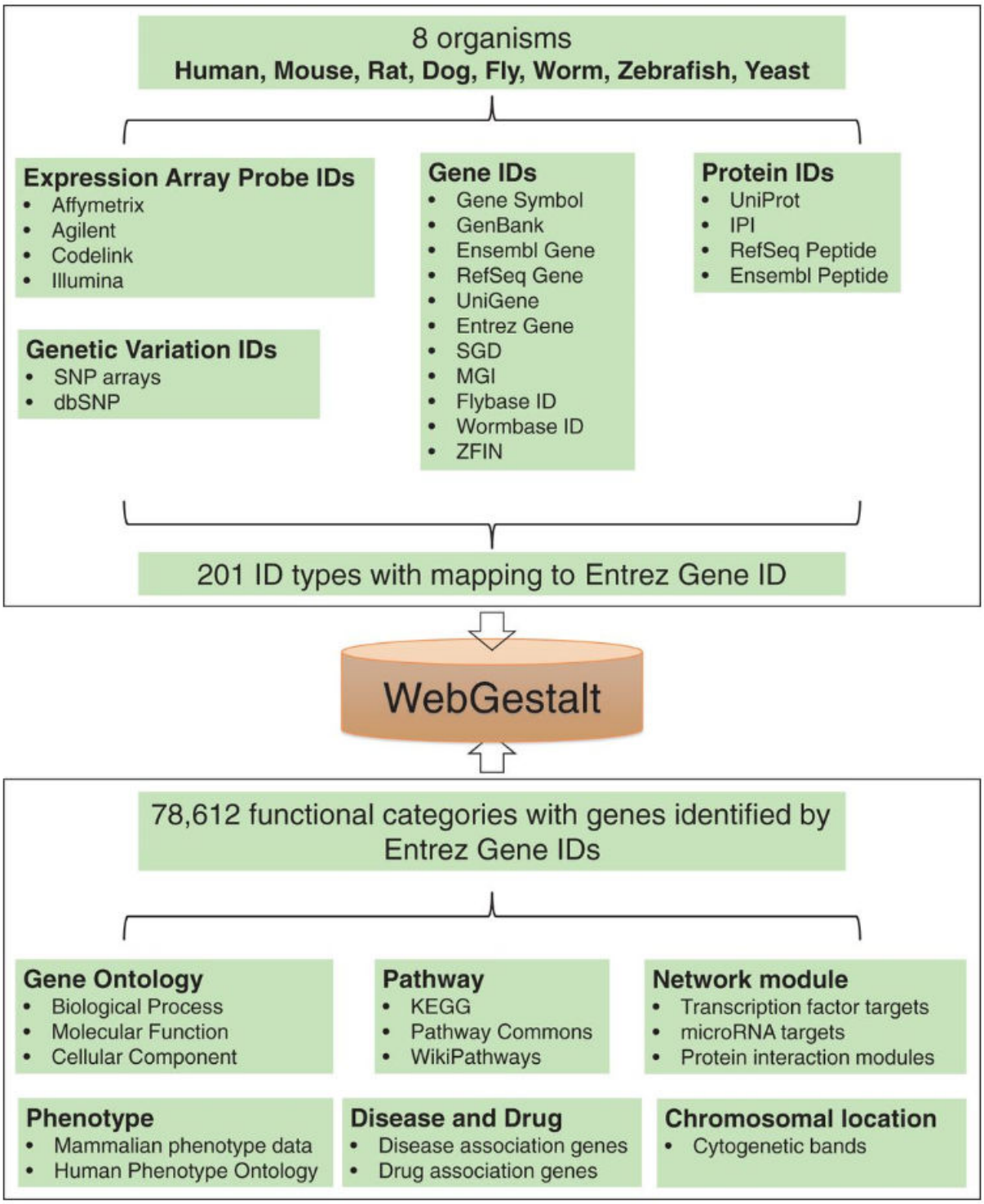


Figure 18 : Architecture de la plateforme WebGestalt

La plateforme WebGestalt permet d'associer les différents gènes et produits de gènes de 8 organismes différents à différentes catégories. Cela permet de réaliser des analyses d'enrichissement en termes de Gene Ontology, Pathway, Réseau, Phénotype, Maladie ou localisation chromosomique.

(D'après Wang et al., 2013).

Pour réaliser cette analyse, il s'agit dans un premier temps de définir la liste de gènes de référence qui peut correspondre au génome complet ou à la liste de gènes présents sur la puce Affymetrix « mmusculus_affy_mogene_1_0_st_v1 » par exemple.

Il est également nécessaire d'effectuer une correction de la p-value par test multiple, par exemple la méthode BH (Benjamini et Hochberg, 1995), afin d'éliminer la possibilité d'identifier des catégories par le biais du hasard.

Dans le cadre de l'enrichissement en termes de Gene Ontology, il est alors possible de visualiser les résultats de l'analyse sous la forme de trois graphiques acycliques dirigés (DAG) correspondant aux trois catégories de Gene Ontology « processus biologique », « fonction moléculaire » et « compartiment cellulaire » (***figure 19***). De manière interactive, il est possible, en sélectionnant un nœud du DAG, d'ouvrir une table (***tableau 9***) montrant les gènes inclus dans la catégorie choisie de GO.

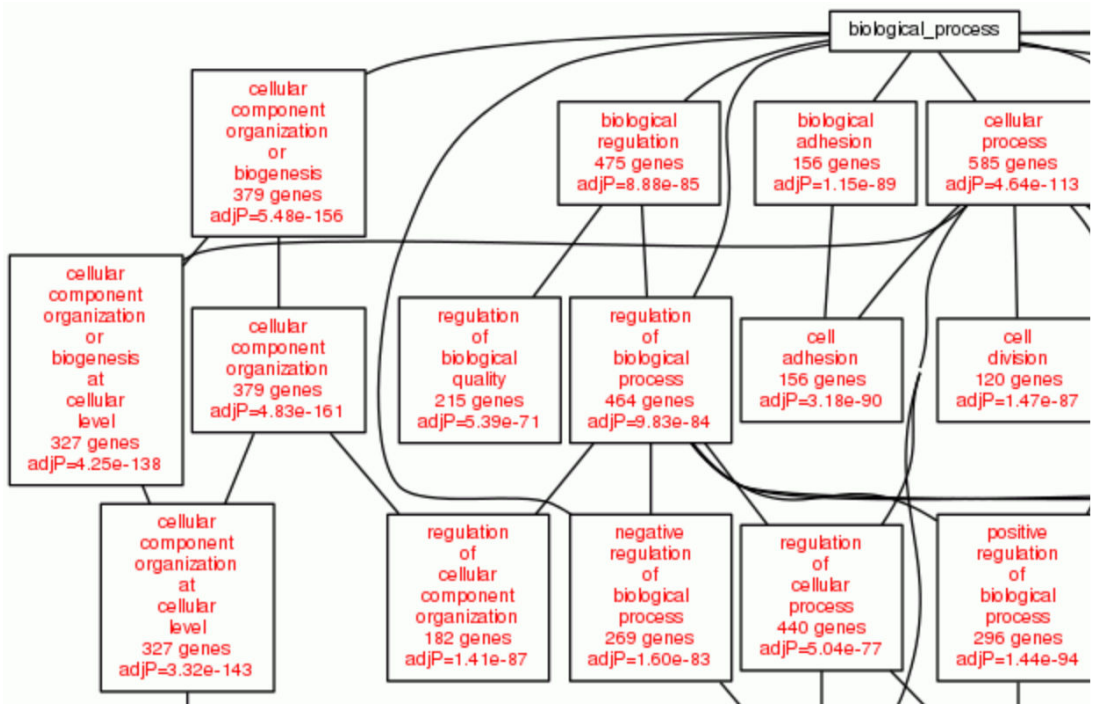


Figure 19: Graphiques acycliques dirigés

Le DAG regroupe les catégories enrichies et aide l'utilisateur à identifier les éléments biologiques importants méritant d'être analysés plus en détail. Chaque nœud montre le nom de la catégorie de GO, le nombre de gènes dans la catégorie et la p-value ajustée qui indique la significativité de l'enrichissement.

Database:biological process	Name:positive regulation of cell proliferation	ID:GO:0008284				
C=599; O=92; E=34.17; R=2.69; rawP=1.88e-18; adjP=2.42e-16						
Index	UserID	Value	Gene Symbol	Gene Name	EntrezGene	Ensembl
1	16423	NA	Cd47	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	16423	ENSMUSG00000055447
2	15904	NA	Id4	inhibitor of DNA binding 4	15904	ENSMUSG00000021379
3	11535	NA	Adm	adrenomedullin	11535	ENSMUSG00000030790
4	18414	NA	Osmr	oncostatin M receptor	18414	ENSMUSG00000022146
5	21380	NA	Tbx1	T-box 1	21380	ENSMUSG00000009097
6	18950	NA	Pnp	purine-nucleoside phosphorylase	18950	ENSMUSG00000021871
7	105855	NA	Nckap1l	NCK associated protein 1 like	105855	ENSMUSG00000022488
8	16398	NA	Itga2	integrin alpha 2	16398	ENSMUSG00000015533
9	11482	NA	Acvrl1	activin A receptor, type II-like 1	11482	ENSMUSG00000000530
10	12317	NA	Calr	calreticulin	12317	ENSMUSG00000003814
11	13982	NA	Esr1	estrogen receptor 1 (alpha)	13982	ENSMUSG00000019768
12	20204	NA	Prrx2	paired related homeobox 2	20204	ENSMUSG00000039476
13	18128	NA	Notch1	notch 1	18128	ENSMUSG00000026923
14	54598	NA	Calcrl	calcitonin receptor-like	54598	ENSMUSG00000059588
15	20304	NA	Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5	20304	ENSMUSG00000035042
16	22418	NA	Wnt5a	wingless-related MMTV integration site 5A	22418	ENSMUSG00000021994
17	19664	NA	Rbpj	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	19664	ENSMUSG00000039191

Tableau 9 : Gènes inclus dans une catégorie de GO

La table fournit également le nombre total de gènes dans la catégorie (C), le nombre de gènes se trouvant dans la liste de gènes d'intérêts et dans la catégorie (O), le nombre de gènes attendu dans la catégorie dans l'hypothèse où il n'y a pas d'enrichissement (E), le ratio d'enrichissement (R), la p-value provenant du test hypergéométrique (rawP) et la p-value ajustée d'après l'ajustement par test multiple.

Résultats

La myostatine, un membre de la famille des TGFβ, est un régulateur négatif de la croissance musculaire et représente un acteur incontournable de l'équilibre entre anabolisme et catabolisme dans le muscle. Dans de nombreuses maladies musculaires, cet équilibre est altéré. Des mutations « perte de fonction » du gène de la myostatine associées à une hypertrophie musculaire ont été décrites dans différentes espèces (souris, bovin, chien, mouton, poisson..). Le rôle de la myostatine s'exerce à plusieurs étapes de la myogénèse : détermination du nombre des fibres musculaires, différenciation, croissance des myofibres, contrôle de l'équilibre hypertrophie/atrophie. Une des lignes de recherche dans un contexte thérapeutique est le ciblage de la voie de signalisation de la myostatine via ses inhibiteurs. Parmi ses inhibiteurs, nous nous sommes focalisés sur les protéines GASP, GASP-1 et GASP-2, qui sont les uniques représentantes d'une famille de protéines à multidomaines.

Afin de mieux appréhender le rôle de ces protéines, le laboratoire a généré des lignées murines sur-exprimant *Gasp-1* (TgGasp-1) ou *Gasp-2* (TgGasp-2). Si avant mon arrivée au laboratoire, les souris TgGasp-1 avaient été caractérisées phénotypiquement au niveau musculaire, la lignée TgGasp-2 n'avait pas encore été établie. D'autre part, afin de déterminer quels acteurs moléculaires peuvent être dérégulés lors de la sur-expression de GASP-1, une étude transcriptomique a été entreprise à partir de myoblastes primaires sur-exprimant ou non *Gasp-1*.

1. Étude *in vivo* du rôle de la protéine GASP-2

1.1. Création d'un modèle de souris sur-exprimant GASP-2

1.1.1. Construction du vecteur de sur-expression psurgasp-2

La construction du vecteur de sur-expression psurgasp-2 a consisté à cloner la séquence de l'ADNc de *Gasp-2* dans le vecteur d'expression pcDNA3.1-V5/His. Le but est de créer par transgenèse aléatoire un modèle murin exprimant de façon constitutive le transgène *Gasp-2*.

Ce vecteur d'expression permet de placer sous le contrôle du promoteur CMV, la séquence d'ADN codant pour la protéine GASP-2 et de réaliser une fusion traductionnelle de cette protéine en C-terminal avec l'épitope V5 couplé à une étiquette 6Xhis. L'amplification de la séquence codante de *Gasp-2* (***figure 20***) a été réalisée à partir d'ADNc issu de la rétrotranscription de 1 µg d'ARN totaux de muscle squelettique de souris de fond génétique FVB. La séquence amplifiée a tout d'abord été clonée dans le vecteur pCR-TOPO®TA. Après vérification de l'absence de mutations ponctuelles par séquençage de l'insert, le

plasmide amplifié a été digéré par les enzymes BamHI et NotI, deux sites de restrictions uniques. L'insert de 1,6 kb a été purifié sur gel avant d'être cloné dans le vecteur d'expression digéré préalablement par les mêmes enzymes. Le plasmide nouvellement obtenu a été vérifié par séquençage avant d'être utilisé pour la transgenèse. Nous avons également vérifié que la séquence clonée se situait bien dans le bon cadre de lecture.

```
ATGCCTGCCCCACAGCCATTCCTGCCTCTGCTCTTTGTCTTCGTGCTCATCCATCTGACCTCGGAGACCAACCTGC
TGCCAGATCCCGGAAGCCATCCTGGCATGTGCCCCAACGAGCTCAGCCCCCACCTGTGGGTCGACGCCCAGAGCAC
CTGTGAGCGTGAGTGTACCGGGGACCAGGACTGTGCGGCATCCGAGAAGTGCTGCACCAATGTGTGTGGGCTGCAG
AGCTGCGTGGCTGCCCGCTTTCCCAGTGGTGGCCCAGCTGTACCTGAGACAGCAGCCTCCTGTGAAGGCTTCCAAT
GCCCACAACAGGGTTCTGACTGTGACATCTGGGATGGGCAGCCAGTTTGTCGCTGCCGTGACCGCTGTGAAAAAGA
ACCCAGCTTCACATGTGCTTCTGATGGCCTTACCTATTACAACCGCTGCTACATGGACGCAGAAGCCTGCCTGCGG
GGTCTCCACCTGCACGTTGTACCCTGTAAGCACATTCTCAGTTGGCCGCCCAGCAGCCCGGGACCACCCGAGACCA
CTGCTCGCCCAACCCCTGGGGCTGCTCCCATGCCACCTGCCCTGTACAACAGCCCCTCACCACAGGCAGTGCATGT
TGGGGGGACAGCCAGCCTCCACTGTGATGTTAGTGGCCGTCCACCACCTGCTGTGACCTGGGAGAAGCAGAGCCAT
CAGCGGGAGAACCTGATCATGCGCCCTGACCAAATGTATGGCAACGTGGTTGTCACCAGTATCGGACAGCTAGTCC
TCTACAATGCTCAGTTGGAGGATGCGGGCCTGTATACCTGCACTGCACGAAACGCTGCCGGCCTGCTGCGGGCCGA
CTTTCCCCTTTCCGTTTTACAGCGGGCAACTACTCAGGACAGGGACCCAGGTATCCCAGCCTTGGCTGAGTGCCAG
GCCGACACACAAGCCTGTGTTGGGCCACCTACTCCCCATCATGTCCTTTGGCGCTTTGACCCACAGAGAGGCAGCT
GCATGACATTCCCAGCCCTCAGATGTGATGGGGCTGCCCGGGGCTTTGAGACCTATGAGGCATGCCAGCAGGCCTG
TGTTCGTGGCCCCGGGGATGTCTGTGCACTGCCTGCAGTTCAGGGGCCCTGCCAGGGCTGGGAGCCACGCTGGGCC
TACAGCCCACTGCTACAGCAGTGCCACCCCTTTGTATACAGTGGCTGTGAAGGAAACAGCAATAACTTTGAGACCC
GGGAGAGCTGTGAGGATGCTTGCCCTGTACCACGCACACCACCCTGTCGTGCCTGCCGCCTCAAGAGCAAGCTGGC
TCTGAGCTTGTGCCGCAGTGACTTTGCCATCGTGGGGAGACTCACAGAGGTCCTGGAGGAGCCCGAGGCTGCAGGC
GGCATAGCTCGTGTGGCCTTGGATGATGTGCTAAAGGACGACAAGATGGGCCTCAAGTTCTTGGGCACCAAATACC
TGGAGGTGACATTGAGTGGCATGGACTGGGCCTGCCCATGCCCCAACGTGACAGCTGTCGATGGGCCACTGGTCAT
CATGGGTGAGGTTCGTGAAGGTGTGGCTGTGTTGGACGCCAACAGCTATGTCCGTGCTGCCAGCGAGAAGCGAGTC
AAGAAGATTGTGGAACTGCTCGAGAAGAAGGCTTGTGAACTGCTCAACCGCTTCCAAGACTAG
```

Figure 20 : Séquence de l'ADNc de *Gasp-2* insérée dans le vecteur de sur-expression

*La séquence codante de Gasp-2 a été amplifiée de manière à ce que le codon stop de Gasp-2 ne se retrouve pas dans le transgène. Ainsi la transcription du transgène TgGasp-2 continuera jusqu'au prochain codon stop qui se situe en 3' du tag histidine. La protéine GASP-2 sera fusionnée avec le tag de l'épitope V5 et du tag polyhistidine (**figure 21**).*

1.1.2 Génération des lignées TgGasp-2

Avant d'injecter le transgène dans les ovocytes de souris, nous avons digéré le vecteur par les enzymes SalI et NsiI pour libérer la séquence minimum à microinjecter (***figure 21***), puis nous avons purifié la séquence par précipitation à l'éthanol 100%.

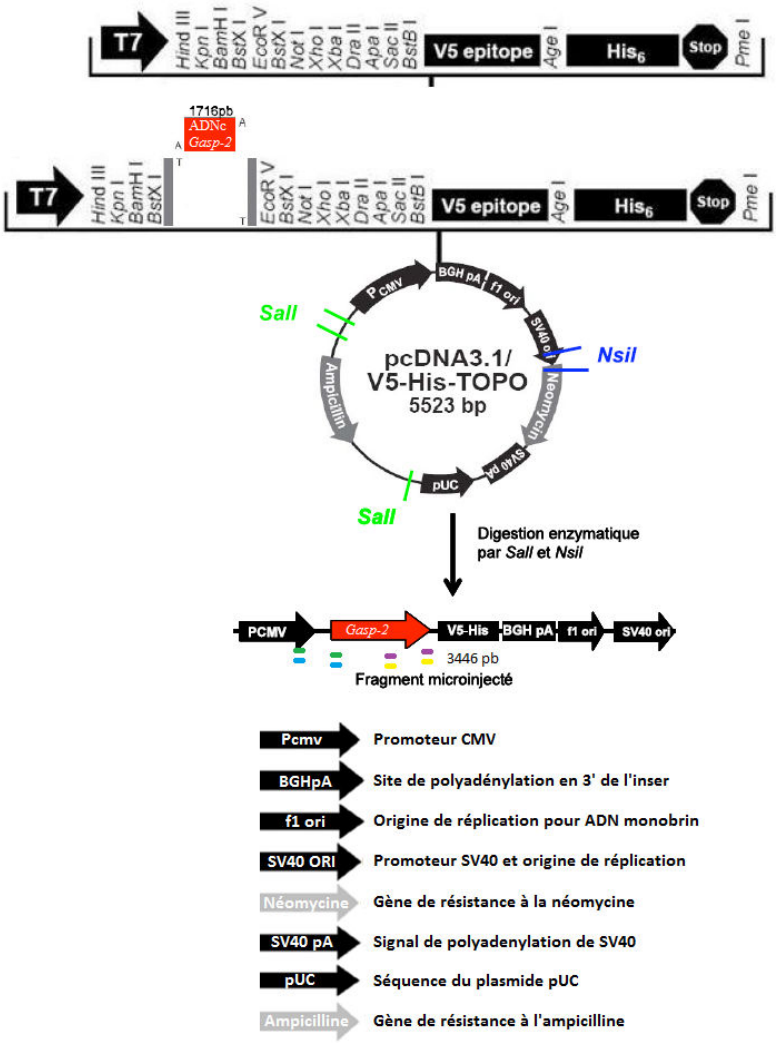


Figure 21 : Représentation du vecteur utilisé pour cloner le transgène CMV*Gasp-2*

Les enzymes de restrictions BamH1 et Not1 sont utilisées sur le vecteur de sur-expression pcDNA3.1/V5-His-TOPO® (Invitrogen) afin de générer des bouts saillants (résidus désoxythymidine (T) saillant en 3') qui serviront de site d'intégration pour l'insert (ADNc de Gasp-2) qui est bordé de part et d'autre de résidus deoxyadenosines (A) en 3'. Le transgène de forme linéaire utilisé pour la microinjection est un des produits de digestion de psurgasp-2 par SalI et NsiI, soit le fragment de 3446 pb qui comprend le promoteur du CMV, la séquence codante de Gasp-2, l'épitope V5, le tag polyhistidine, le signal de polyadénylation de BGH et les origines de réplication f1 et SV40. Deux couples d'amorces (trait vert et trait bleu) en chevauchement entre le promoteur CMV et l'ADNc de Gasp-2 et deux couples d'amorces du côté 3' du transgène ont été utilisés pour génotyper les individus.

L'étape de microinjection a été réalisée par l'équipe de JL Vilotte (UMR GABI, Jouy en Josas). Le transgène a été injecté dans des ovocytes de souris de fond génétique FVB (***figure 22***).

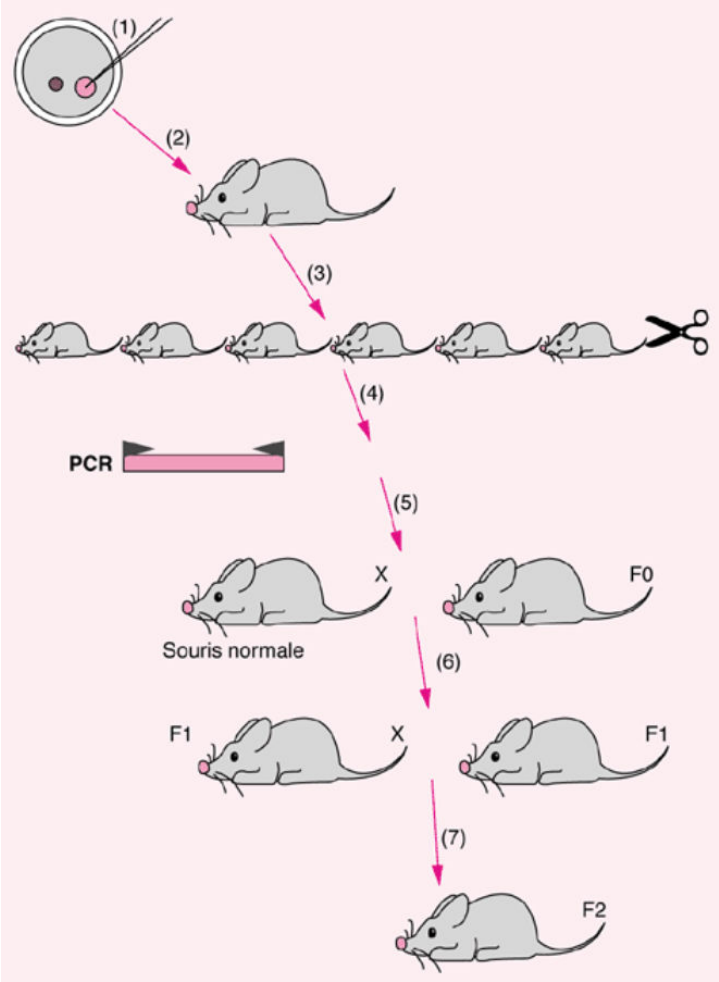


Figure 22 : Les différentes étapes de la transgenèse aléatoire

Une suspension d'ADN exogène est micro-injectée sous microscope à l'aide de micro-manipulateurs dans un des deux pronoyaux d'un œuf tout juste fécondé, au stade une cellule [1]. Les embryons manipulés sont réimplantés dans l'oviducte d'une mère porteuse [2]. Environ trois semaines après la naissance, une biopsie de queue est réalisée sur les souriceaux [3] ; l'ADN est extrait et analysé pour la présence du transgène par PCR [4]. Une lignée de souris transgénique est établie en croisant chaque fondateur (F0) avec une souris normale [5] ; des souris transgéniques hétérozygotes (F1) sont ainsi obtenues [6], et éventuellement croisées entre elles pour obtenir des F2 homozygotes pour le transgène [7]. Dans 5% à 10% des cas, l'insertion aléatoire du transgène peut avoir modifié l'expression d'un gène endogène nécessaire au développement. Dans ces cas, il est possible de ne pas obtenir de F2 homozygotes viables.

(D'après Morello, 1999).

Nous avons choisi de travailler avec ce fond génétique car cette lignée est caractérisée par de bonnes performances de reproduction et une bonne survie des ovocytes après injection. Les embryons manipulés ont été réimplantés dans plusieurs mères porteuses de même fond génétique. Les souriceaux obtenus ont ensuite été testés pour la présence du transgène TgGasp-2 par une analyse PCR à partir de l'ADN génomique extrait des queues des souriceaux. Pour cela, deux couples d'amorces ont été choisis en chevauchement entre le vecteur et l'insert : un premier dans la partie 5' du transgène incluant une partie du promoteur CMV et une partie dans l'ADN de *Gasp-2* et le second dans la partie 3' du transgène (***tableau 4***, ***figure 21***). Cette analyse a permis d'identifier quatre individus porteurs d'au moins un transgène dans leur génome. A partir de ces souris transgéniques, appelées fondateurs, nous avons vérifié la transmission du ou des transgènes à la descendance (***tableau 10***). Quatre lignées indépendantes ont été obtenues en les croisant avec des souris non transgéniques de fond génétique FVB. Ces lignées ont été nommées **TgGasp2.1, TgGasp-2.2, TgGasp-2.8 et TgGasp-2.9**.

	Analyse de la descendance		
Fondateur	**Nombre total**	**Individus positifs pour le Tg**	**Transmission du Tg**
Gasp-2.1	22	6	27%
Gasp-2.2	13	9	69%
Gasp-2.8	22	1	4%
Gasp-2.9	12	6	50%

Tableau 10 : Analyse de la descendance

En fonction du nombre de transgènes présent chez les fondateurs, le pourcentage de transmission attendu doit être d'au moins 50% s'il n'y a pas d'effet direct ou indirect du transgène sur la viabilité et le système de reproduction des animaux par exemple.

En considérant qu'un seul transgène est intégré dans le génome, la transmission doit répondre aux lois de l'hérédité mendélienne, il en découle qu'elle doit être égale à 50%. Si le nombre de transgènes intégrés dans le génome est supérieur à 2 et qu'ils sont génétiquement indépendants, le taux de transmission attendu est supérieur à 50%. Au cours de la première génération, ce pourcentage de transmission peut également dépendre de l'existence d'un mosaïcisme chez l'animal fondateur, dans ce cas, nous identifirons un pourcentage de transmission en dessous de 50%. Cependant, à partir de la seconde génération, nous devons retrouver une hérédité mendelienne. Pour les lignées TgGasp-2.1 et TgGasp-2.8, le taux de transmission est respectivement de 27% et 4%, bien inférieur aux valeurs attendues. En

considérant que le fondateur n'est pas un individu mosaïque, ce résultat montre que le transgène doit avoir un effet délétère sur les individus transgéniques dû soit au site d'intégration du transgène soit au niveau d'expression du transgène. Les lignées TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9 ont un taux de transmission du transgène supérieur à 50%. Ces valeurs sont en accord avec une transmission mendélienne. Nous pouvons donc supposer que la surexpression de Gasp-2 n'a pas d'effet délétère sur la survie des individus et que les résultats obtenus pour les lignées TgGasp-2.1 et 2.8 sont dus au lieu d'intégration du transgène. L'observation de la seconde génération dans la lignée TgGasp-2.8 (Annexe2) nous permet de considérer que le faible taux de transmission n'est pas associé à du mosaïcisme. En effet, l'individu F1 obtenu à partir du fondateur présente également un faible taux de transmission du transgène égal à 25%. Cette seconde génération appuie notre hypothèse. Dans le cas de la lignée TgGasp-2.1, nous ne pouvons pas exclure que le fondateur ne soit pas un individu mosaïque car à la seonde génération, le taux de transmission du transgène est relativement élevé.

1.1.3 Stabilisation des lignées TgGasp-2

Chaque fondateur possède un nombre de copies du transgène différent et les sites d'insertions ont une très faible probabilité d'être identiques chez ces individus. De plus, ces individus sont hétérozygotes pour chaque locus où s'est intégré le transgène. Nous avons cherché à obtenir des lignées homozygotes pour le transgène à partir de chaque fondateur. Cette étape consiste à réaliser des croisements entre individus hétérozygotes pour les deux mêmes allèles aux mêmes locus, afin que les lignées hétérozygotes (Tg/WT) deviennent (Tg/Tg) aux différents loci d'insertion du transgène. Les descendants ont été génotypés par PCR quantitative afin de sélectionner les individus homozygotes Tg/Tg. Nous avons pu obtenir trois lignées à l'état homozygote : les lignées TgGasp-2.1 TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9. Enfin, la lignée TgGasp-2.8 n'a jamais donné de descendants homozygotes avec une perte du transgène au cours des générations.

1.2. Choix du modèle murin de sur-expression

L'insertion aléatoire d'un transgène peut entraîner des phénotypes dûs à l'insertion du transgène et non au transgène lui-même. Afin de s'affranchir de cet effet de position, il est nécessaire de caractériser les phénotypes sur au moins deux lignées. La première étape avant d'initier l'analyse phénotypique est de sélectionner les lignées les plus intéressantes pour l'étude. Les critères utilisés sont le nombre de transgènes et son niveau d'expression, c'est-à-dire l'expression de *Gasp-2*.

1.2.1. Quantification du nombre de copies du transgène

L'estimation du nombre de copies du transgène dans le génome se détermine par PCR quantitative à partir du nombre de copies de Gasp-2 chez les lignées transgéniques et la lignée FVB en utilisant des amorces spécifiques de l'ADNc et de l'ADN génomique de Gasp-2. En effet, la lignée FVB a deux copies endogènes de *Gasp-2* dans son génome or le RQ (le RQ est une méthode d'analyse des données de PCR quantitative) associé à ce nombre vaut arbitrairement 1. Ainsi, si une lignée transgénique a un RQ associé au nombre de copies de *Gasp-2* égal à 5 alors le nombre de copies de *Gasp-2* de cette lignée sera de 2*5 = 10 copies. Pour obtenir le nombre de copies exogènes de *Gasp-2* (le nombre de copie du transgène), il suffit de soustraire les 2 copies endogènes de *Gasp-2*. Ainsi, une lignée avec un RQ associé au nombre de copies de *Gasp-2* égal à 5 posséde 8 copies du transgène (2*5-2 = 8). Comme il est important que la quantité d'ADN analysée soit la même entre les différents individus, la quantité d'ADN est normalisée par un gène de référence, *Ccr5* dont le nombre de copies est identique entre la lignée sauvage et la lignée TgGasp-2.

Comme le promoteur CMV n'est pas présent chez les souris sauvages FVB, il n'est pas possible d'estimer directement le nombre de transgènes en utilisant les amorces spécifiques du promoteur CMV, mais cela permet de confirmer les résultats obtenus.

Nous avons identifié 8 copies chez les individus homozygotes de la lignée TgGasp-2.1, 10 copies pour la lignée TgGasp-2.2 et 4 à 6 copies pour la lignée TgGasp-2.9. Les individus hétérozygotes de chaque lignée présentent un nombre de copies deux fois plus faible. Cette analyse a été réalisée sur les individus de plusieurs générations successives pour vérifier la stabilité des transgènes (***tableau 11***).

Les trois lignées testées ont un nombre suffisant de copies du transgène. Cependant, ce nombre n'est pas lié à l'expression de *Gasp-2* exogène. Il faut donc mesurer cette dernière pour déterminer quelles sont les lignées les plus adéquates. Après avoir identifié le nombre de copies du transgène, nous avons regardé si ce transgène était exprimé chez les différents individus.

Lignée	génotype	Nombre estimé de copies
TgGasp-2.1.16	Tg/Tg	8 copies
TgGasp-2.1A	Tg/Tg	8 copies
TgGasp-2.1B	Tg/Tg	8 copies
TgGasp-2.1.7	Tg/+	4 copies
TgGasp-2.9.20	Tg/Tg	5 copies
TgGasp-2.9.62	Tg/Tg	5 copies
TgGasp-2.9.112	Tg/+	2 copies
TgGasp-2.2.3	Tg/+	5 copies
TgGasp-2.2.5	Tg/+	5 copies

Tableau 11 : Exemple de résultats obtenus pour l'estimation du nombre de copies du transgène dans les lignées TgGasp-2

*Le nombre de copies du transgène des lignées TgGasp-2.1, TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9 ainsi que de souris sauvages FVB a été estimé à partir d'ADN génomique par qPCR SybrGreen. Des amorces spécifiques de l'ADNc et de l'ADN génomique de Gasp-2 ainsi que du promoteur CMV et du gène de référence CCR5 ont été utilisées. Les données d'expressions ont été normalisées grâce à la méthode des RQ. Principe de l'analyse : le RQ d'une souris sauvage est fixé à 1 et les amorces spécifiques de Gasp-2 sont spécifiques de l'ADNc et de l'ADN génomique de Gasp-2. Il est donc possible en se basant sur le nombre connu de copies de Gasp-2 des souris sauvages (2 copies endogènes) de connaître le nombre total de Gasp-2 chez une souris transgénique (qui est égal à 2 * RQ) et donc de connaître le nombre exogène de Gasp-2 (qui correspond au nombre de transgènes et qui est égal à 2 * RQ – 2 copies endogènes). Comme le promoteur CMV n'est pas présent chez les souris sauvages FVB, il n'est pas possible d'estimer directement le nombre de transgène en utilisant les amorces spécifiques du promoteur CMV, mais cela permet de confirmer les résultats obtenus.*

1.2.2 Mesure de l'expression de *Gasp-2* dans chaque lignée TgGasp-2

Le site d'insertion du transgène influe sur l'expression de celui-ci. Nous avons donc mesuré l'expression de *Gasp-2* dans différents tissus pour chacune des 3 lignées : les muscles des bras, le cerveau, le coeur, les quadriceps, le muscle gastrocnémien, les pectoraux. Les résultats de la ***figure 23*** nous montrent une forte expression du transgène chez l'ensemble des individus testés et quelque soit le tissu. En effet, le promoteur utilisé est le CMV, celui-ci entraînant une forte expression du gène qu'il contrôle. De façon plus précise, nous observons une sur-expression d'un facteur 1000 chez la lignée TgGasp-2.1 homozygote pour les muscles des bras, le cerveau, le coeur, les quadriceps, le gastrocnémien et les pectoraux. Comme attendu, le niveau d'expression est plus faible chez les individus hétérozygotes de la lignée TgGasp-2.1.

Nous observons une sur-expression d'un facteur d'environ 500 pour les individus homozygotes de la lignée TgGasp-2.9 pour les muscles des bras. La sur-expression est cependant un peu plus importante au niveau des quadriceps. Le niveau d'expression est plus faible chez les individus hétérozygotes de la lignée TgGasp-2.9.

Enfin, nous observons une sur-expression d'un facteur d'environ 100 pour les individus hétérozygotes de la lignée TgGasp-2.2 au niveau du cerveau et d'un facteur d'environ 1000 au niveau des quadriceps.

1.2.3 Étude de la quantité des protéines GASP-2 dans le sang

Nous avons identifié plusieurs copies du transgène dans les trois lignées TgGasp-2 et observé une sur-expression de *Gasp-2* dans les tissus testés. Qu'en est-il de la protéine? Le transgène est-il correctement traduit et la protéine GASP-2 est-elle bien sécrétée? Nous avons donc mesuré la quantité de la protéine GASP-2 dans le sérum de souris des lignées TgGasp-2.1, TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9 par un test ELISA (***figure 24***). Quelque soit l'âge des individus testés, la protéine est présente en quantité plus importante dans les lignées transgéniques par rapport à la lignée contrôle. Pour la lignée TgGasp-2.9, par exemple, GASP-2 est exprimée 4 fois plus que dans la lignée FVB contrôle.

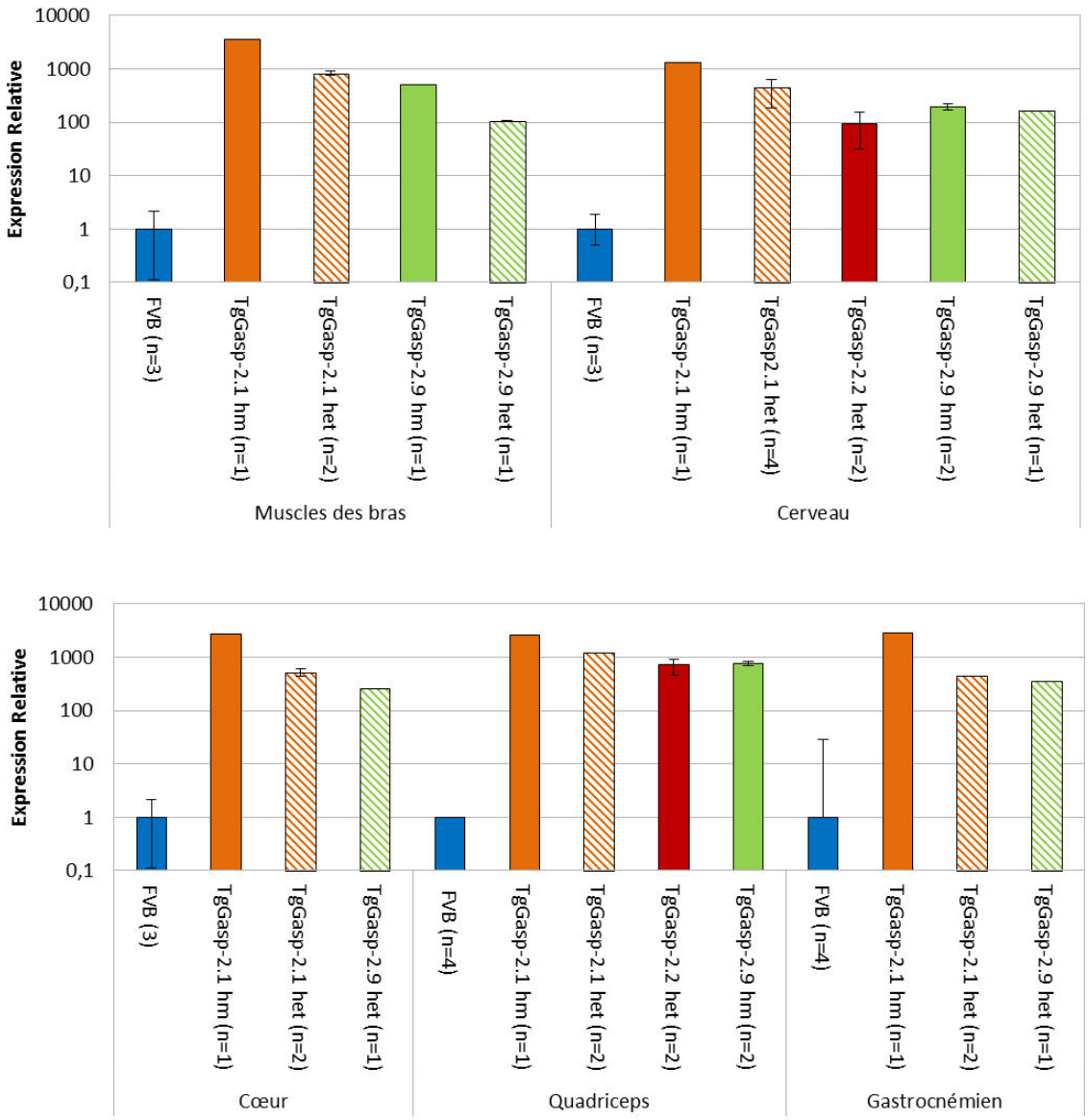


Figure 23 : Expression relative de *Gasp-2* dans les lignées TgGasp-2

Certaines souris des lignées TgGasp-2.1, TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9 ont été sacrifiées afin de mesurer l'expression de Gasp-2. Dans cette optique, la plupart de leurs organes a été prélevée et certains d'entre eux (muscles du bras, quadriceps et gastrocnémien, pectoraux, cerveau et cœur) ont été broyés afin d'extraire leurs ARN en vue d'une quantification par PCR quantitative Taqman de l'expression de Gasp-2 après rétrotranscription des ARN en ADNc. Lors de cette quantification par PCR quantitative, des sondes Taqman spécifiques de Gasp-2 et des gènes de références Dffa et Gapdh ont été utilisées. Les données d'expression ont été normalisées grâce à la méthode des RQ. Pour chaque groupe d'organes, la valeur moyenne des échantillons FVB a été ramenée à 1 et les valeurs des autres lignées ont été normalisées en fonction de cette valeur. Les souris transgéniques montrent une augmentation de l'expression de Gasp-2 comparée à l'expression de Gasp-2 mesurée chez les individus sauvages. Les histogrammes barrés représentent les individus hétérozygotes. hm : homozygote ; het : hétérozygote ; (n) : nombre d'individus testés.

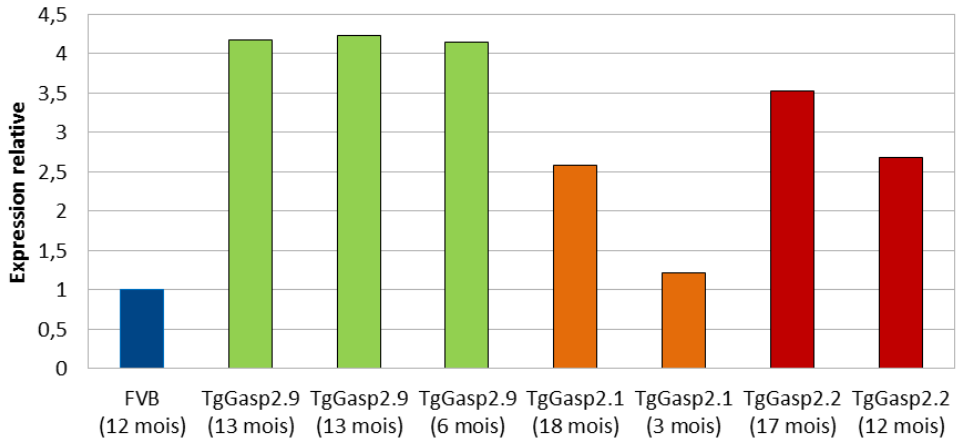


Figure 24 : Expression relative de la protéine GASP-2 dans le sérum des lignées TgGasp-2

À partir de sang de souris homozygotes TgGasp-2 et de souris sauvages, des tests ELISA ont été réalisés en utilisant des anticorps anti-GASP-2 afin de mesurer la quantité de GASP-2 dans le sérum de ces souris. Sur le graphique ci-dessus, la quantité de protéines GASP-2 est donnée en fonction de la quantité de protéine GASP-2 mesurée dans l'échantillon de sérum prélevé chez une souris sauvage de fond génétique FVB (cette quantité étant fixée à 1). Les souris de la lignée TgGasp-2.9 testées sur-expriment environ 4 fois GASP-2, les souris de la lignée TgGasp-2.2 testées sur-expriment en moyenne 3 fois et les souris de la lignée TgGasp-2.1 testées sur-expriment environ 1,5 GASP-2.

1.2.4 Généalogies

À ce stade, les souris des lignées homozygotes pour chaque lignée (TgGasp-2.1, TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9) ont été mises en accouplement pour obtenir un nombre suffisant d'individus et réaliser les études phénotypiques.

Comme le montrent les généalogies mises en ***annexe 2***, certains croisements homozygotes (hm) n'ont jamais donné de descendants alors que d'autres croisements homozygotes ont donné des portées allant de quatre à huit souriceaux (les souris sauvages FVB pouvant donner naissance à des portées allant jusqu'à douze souriceaux). Pour contourner et comprendre ce problème, les souris transgéniques à la base des accouplements ne donnant pas de descendant

ont été croisées avec des souris sauvages FVB (croisement het) selon deux configurations, c'est-à-dire des croisements entre les souris femelles transgéniques et des souris mâles sauvages (croisement A) et des croisements entre les souris mâles transgéniques et des souris femelles sauvages (croisement B). Les croisements A n'ont quasiment jamais donné de descendants alors que les croisements B n'ont montré aucun problème de reproduction (***tableau 12***). Une expressivité variable ou une pénétrance incomplète pourrait expliquer cette observation. Le maintien des lignées a nécessité des croisements hétérozygotes entre des mâles transgéniques et des femelles sauvages et des croisements homozygotes pour l'analyse phénotypique. Malgré tout, en ce qui concerne la lignée TgGasp-2.1, ces différents croisements n'ont donné que très peu de descendants et cette lignée n'a pas pu être maintenue. L'analyse phénotypique a donc été effectuée sur les lignées TgGasp-2.9 et TgGasp-2.2 (***annexe 2***).

	Croisement homozygotes		**Croisement hétérozygote**			
			avec mâle TgGasp-2		**avec femelle TgGasp-2**	
	Nombre de croisements	**Nombre de transmission**	**Nombre de croisements**	**Nombre de transmission**	**Nombre de croisements**	**Nombre de transmission**
TgGasp-2.9	10	6	5	4	1	0
TgGasp-2.2	13	6	6	6	2	0
TgGasp-2.8	0	0	2	0	1	0
TgGasp-2.1	2	0	6	6	2	1

Tableau 12 : Efficacité des croisements des lignées TgGasp-2

Les lignées TgGasp-2.9 et TgGasp-2.2 ont pu être maintenues à l'état homozygote. Ce n'est pas le cas des lignées TgGasp-2.8 et TgGasp-2.1.

1.3. Caractérisation phénotypique

1.3.1. Courbes de croissance

Les premières études phénotypiques concernant les lignées TgGasp-2.9 et TgGasp-2.2 ont porté sur l'obtention de courbes de poids (***figure 25***). Comme les descendants ont été difficiles à obtenir en nombre suffisant pour obtenir les courbes de poids, les données de poids des individus mâles et femelles ont été compilées pour l'obtention des courbes de poids. Nous avons constaté que les individus de la lignée TgGasp-2.2 sont plus lourds que les individus de la lignée FVB. Les individus de la lignée TgGasp-2.9 font sensiblement le même poids que les individus de la lignée FVB.

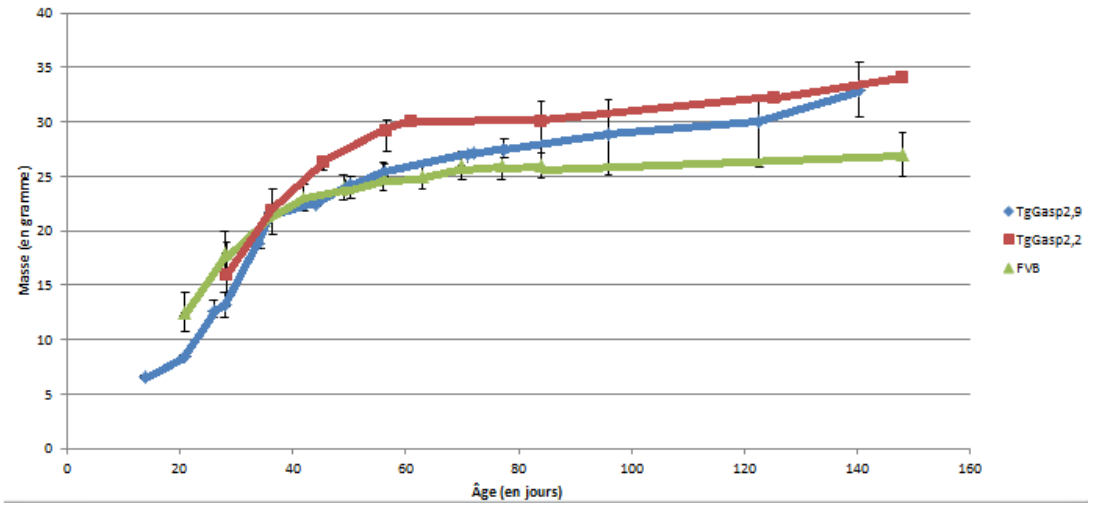


Figure 25 : Courbes de croissance des souris TgGasp-2 et sauvages

Des souris des lignées transgéniques TgGasp-2.9 (n = 16) et TgGasp-2.2 (n= 8) et de la lignée sauvage (n = 40) ont été pesées au cours de leur croissance afin d'établir des courbes de poids. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart moyen.

1.3.2. Caractérisation du phénotype musculaire

<u>Masse corporelle et musculaire</u>

Le rôle qu'exerce GASP-2 comme modulateur de l'activité de la myostatine suggère une implication de GASP-2 dans le développement musculaire. Douze semaines après leur

naissance, plusieurs muscles ont été prélevés chez des souris des deux lignées TgGasp-2 et chez des souris contrôles. Des muscles ont également été prélevés chez des souris présentant une hypertrophie musculaire (i) la lignée TgGasp-1.20, sur-exprimant le gène Gasp-1 et (ii) la lignée Mstn-/-, inactivée pour le gène de la myostatine. Les souris sacrifiées ainsi que les différents muscles prélevés (quadriceps, gastrocnémien, pectoraux, tibialis anterior, soleus, EDL) ont été pesés (***figures 26*** et ***27***).

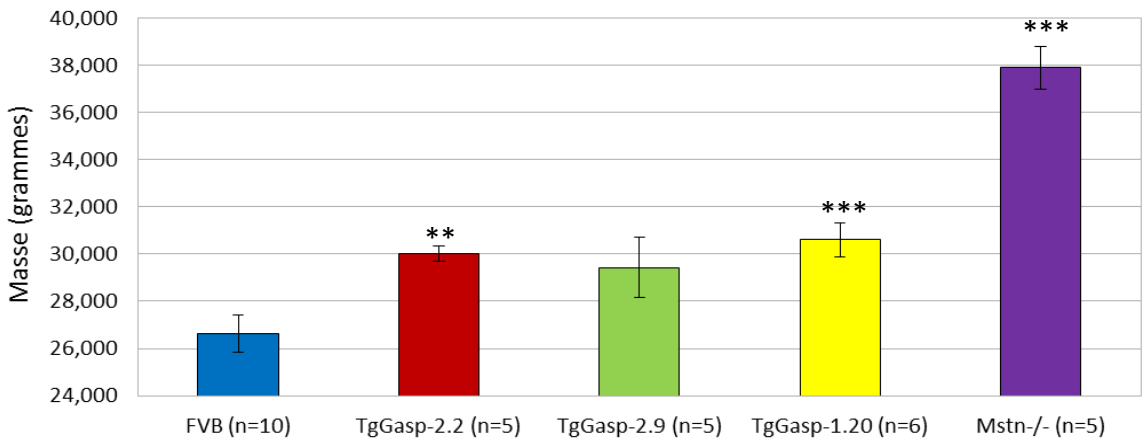


Figure 26 : Evaluation de la masse totale des souris

Des souris, âgées de 12 semaines, des lignées TgGasp-2.2 (n=5), TgGasp-2.9 (n=5), FVB (n=10), TgGasp-1.20 (n=6) et Mstn-/- (n=5) ont été sacrifiées afin de déterminer la masse totale des souris et leur masse musculaire respective. Les barres d'erreurs correspondent au SEM soit à l'écart-type divisé par la racine de l'effectif.

*Les échantillons analysés étant réduits, il n'a pas été possible de vérifier que la distribution de la masse totale des souris suivait la loi normale. L'utilisation du test t de Student n'étant donc pas possible, le test non paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé. Ce test permet de mesurer l'enchevêtrement des données, c'est-à-dire le fait que les valeurs se séparent en deux paquets distincts ou non. Selon ce test, le poids des souris des lignées TgGasp-2.2, TgGasp-1.20 et Mstn-/- est significativement différent du poids des souris de la lignée FVB avec un risque α de 5%. Le poids des souris TgGasp-2.9 n'est pas significativement différent de celui des souris FVB mais une tendance à l'augmentation est visible. * : p-value inférieure à 0.05, ** : p-value inférieure à 0.01, *** : p-value inférieure à 0,001.*

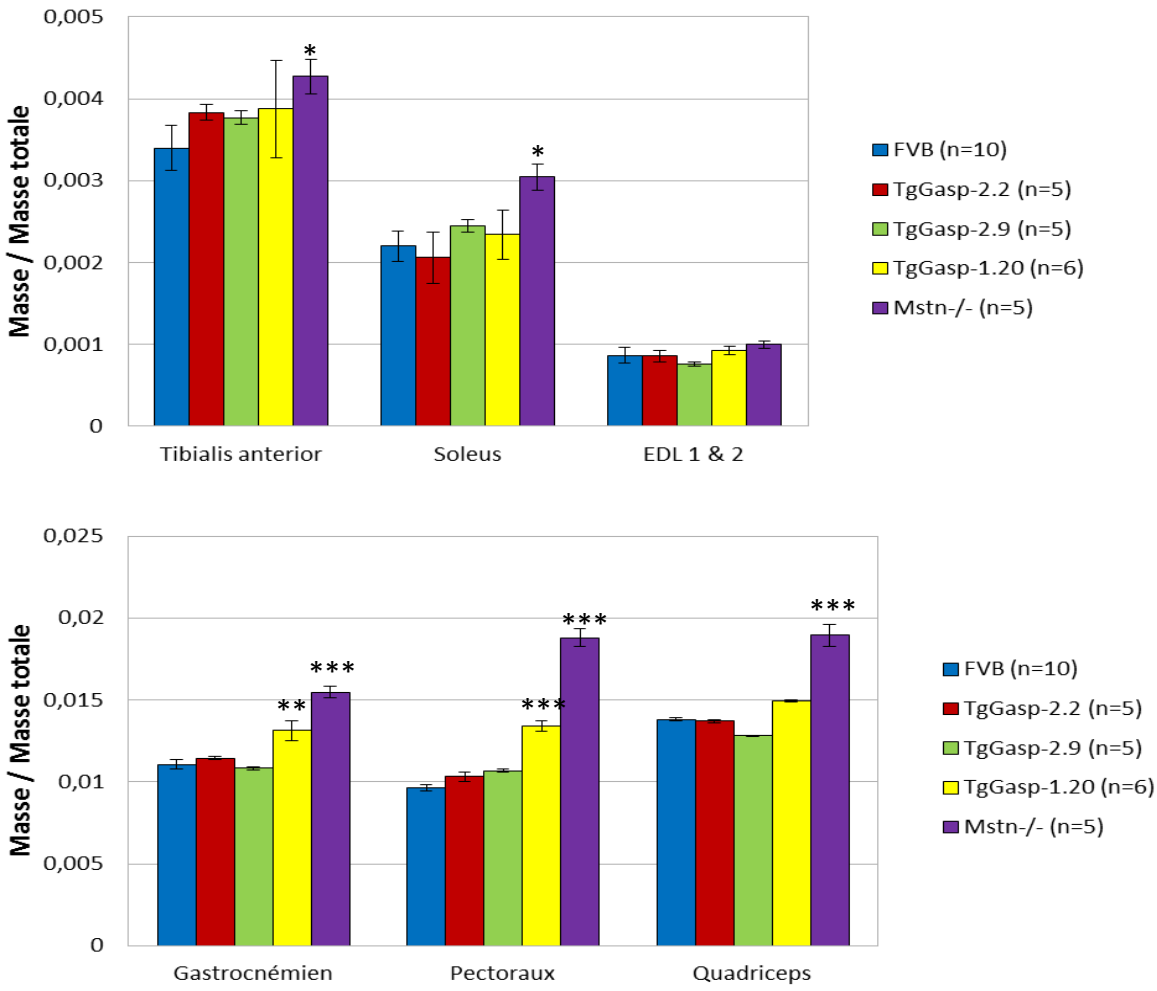


Figure 27 : Evaluation de la masse de différents muscles dans les lignées TgGasp-2 (analyse normalisée)

Des souris, âgées de 12 semaines, des lignées TgGasp-2.2 (n=5), TgGasp-2.9 (n=5), FVB (n=10), TgGasp-1.20 (n=6) et Mstn-/- (n=5) ont été sacrifiées afin de déterminer la masse totale des souris et la masse de certains muscles. Ainsi, les quadriceps, gastrocnémien, pectoraux, tibialis anterior, soleus et EDL ont été prélevés chez ces souris. Les barres d'erreurs correspondent au SEM soit à l'écart-type divisé par la racine de l'effectif. Le test non paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé.

*La masse des muscles prélevés a été normalisée avec la masse totale de l'individu à partir duquel le muscle a été prélevé. Le ratio masse musculaire / masse totale ne diffère pas significativement entre les deux lignées TgGasp-2 et la lignée FVB. Une tendance à l'augmentation est observée pour les deux lignées TgGasp-2 en ce qui concerne le tibialis anterior et les pectoraux. En ce qui concerne le soleus, l'EDL, le gastrocnémien et les quadriceps, aucune tendance ne se dégage. Le ratio musculaire des souris de la lignée Mstn -/- est significativement différent du ratio musculaire des souris de la lignée FVB pour tous les muscles prélevés excepté l'EDL. Le ratio musculaire des souris de la lignée TgGasp-1.20 diffère significativement de celui des souris FVB pour le gastrocnémien et les pectoraux. * : p-value inférieure à 0.05, ** : p-value inférieure à 0.01, *** : p-value inférieure à 0,001.*

Les souris TgGasp-2 présentent une augmentation de la masse corporelle de plus de 10% par rapport aux souris FVB. Cette différence apparait significative pour les animaux de la lignée TgGasp-2.2. Lorsque nous analysons les ratios masse du tissu/masse totale de l'individu pour les muscles des pattes postérieures et les pectoraux, aucune différence significative n'est observée pour les lignées TgGasp-2 et TgGasp-1. Seuls les animaux Mstn -/- présentent une augmentation significative du ratio masse musculaire/masse totale. Les résultats montrent une grande hétérogénéité entre les individus de chaque lignée et le nombre faible d'animaux ne permet pas d'affirmer ou non ces données. De façon étonnante, lorsque nous analysons la masse musculaire des animaux TgGasp-2, sans la normalisation par rapport à la masse corporelle, celle-ci augmente de 10% pour le tibialis anterior par rapport aux animaux contrôles bien que le ratio, lui, ne diffère pas ***(figure 28)***. L'augmentation de la masse musculaire ne semble pas affecter les muscles de la même façon puisqu'aucune différence entre les TgGasp-2 et les FVB n'est identifiée pour les quadriceps. Cette première analyse macroscopique ne donne qu'un aperçu très global du phénotype musculaire et demande une analyse microcopique pour analyser les fibres musculaires.

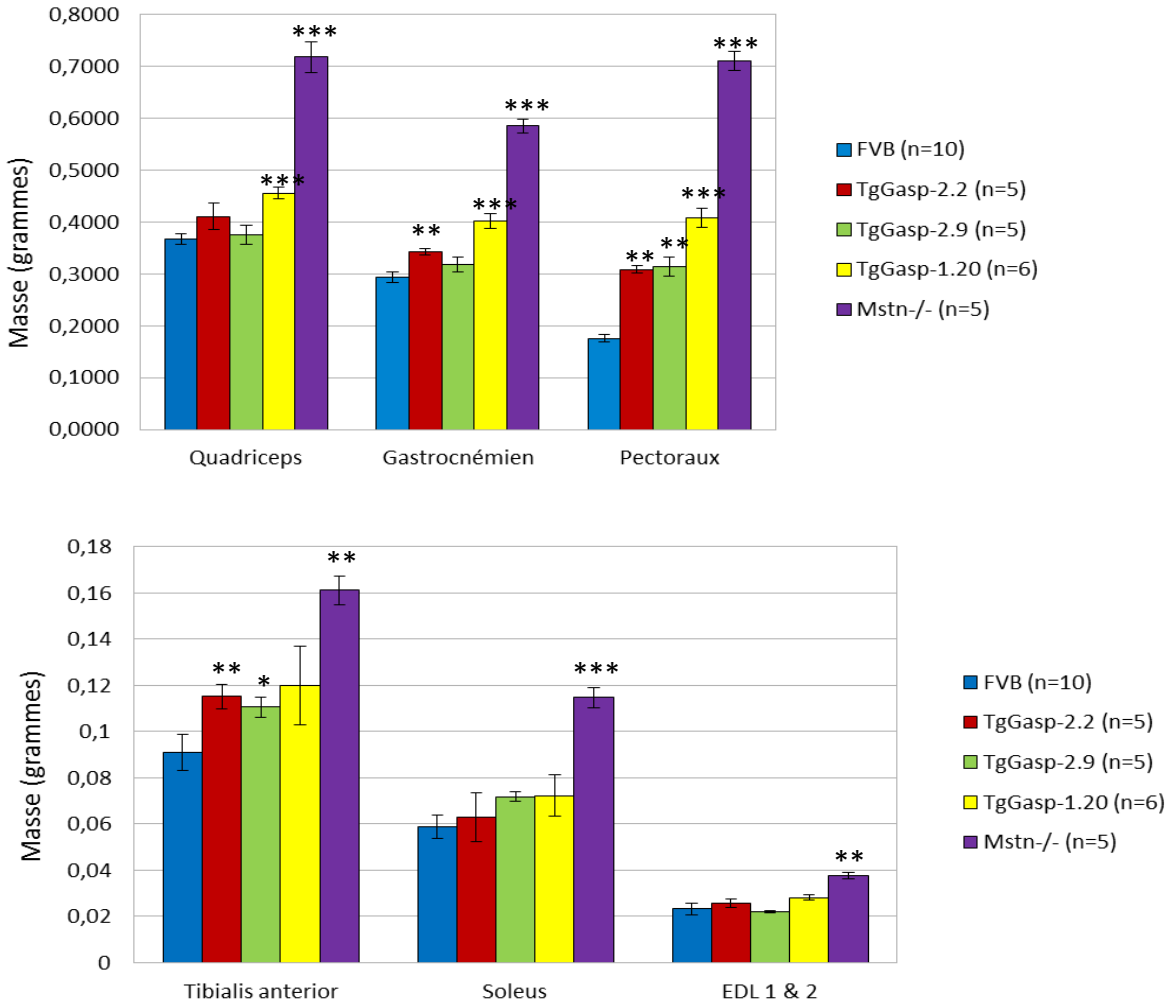


Figure 28 : Evaluation de la masse de différents muscles dans les lignées TgGasp-2 (analyse non normalisée)

*Des souris, âgées de 12 semaines, des lignées TgGasp-2.2 (n=5), TgGasp-2.9 (n=5), FVB (n=10), TgGasp-1.20 (n=6) et Mstn-/- (n=5) ont été sacrifiées afin de déterminer la masse totale des souris et la masse de certains muscles. Ainsi, les quadriceps, gastrocnémien, pectoraux, tibialis anterior, soleus et EDL ont été prélevés chez ces souris. Les barres d'erreurs correspondent au SEM soit à l'écart-type divisé par la racine de l'effectif. Le test non paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé. Pour la lignée TgGasp-2.2, la masse musculaire du gastrocnémien, des pectoraux et du tibialis anterior est significativement plus importante comparée à la lignée sauvage FVB. Pour la lignée TgGasp-2.9, la masse des pectoraux et du tibialis anterior est significativement plus importante comparée à la lignée sauvage FVB. Pour la lignée TgGasp-1.20, la masse des quadriceps, du gastrocnémien et des pectoraux est significativement plus importante comparée à la lignée sauvage FVB. Pour la lignée Mstn-/-, la masse des quadriceps, du gastrocnémien, des pectoraux, du tibialis anterior, du soleus et de l'EDL est significativement plus importante comparée à la lignée sauvage FVB. * : p-value inférieure à 0.05, ** : p-value inférieure à 0.01, *** : p-value inférieure à 0,001.*

Mesure de l'hypertrophie musculaire

Nous observons une probable augmentation de la masse du tibialis anterior et des pectoraux. Afin d'approfondir la caractérisation du phénotypique musculaire, nous avons procédé à la mesure de l'aire des fibres musculaires à partir de coupes du soleus, du tibialis anterior et du gastrocnémien des lignées TgGasp-2.2, TgGasp-2.9 et FVB (***figure 29***). Cela a révélé une hypertrophie des fibres musculaires dans les trois muscles et dans les deux lignées TgGasp-2 comme observée chez les souris TgGasp-1 (***figures 30*** et ***31***).

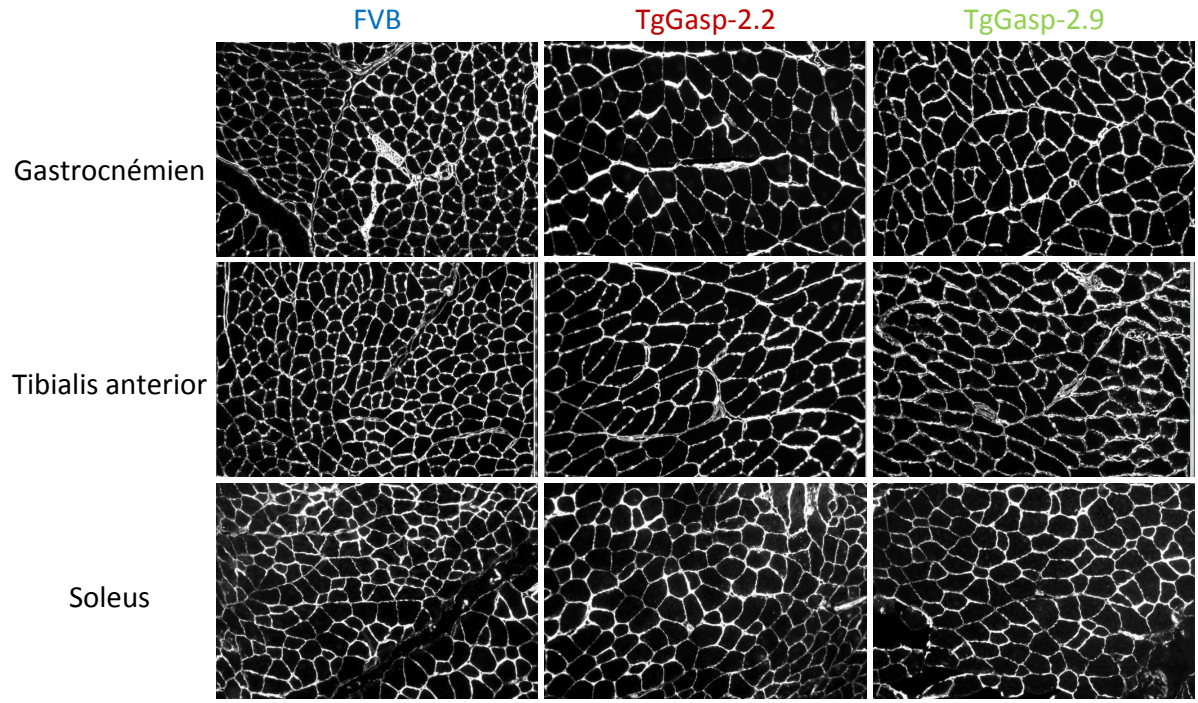


Figure 29 : Coupes histologiques de différents muscles de souris TgGasp-2 et sauvages

Des coupes cryostatiques transversales de différents muscles (soleus, tibialis anterior et gastrocnémien) de souris âgées de 12 semaines des lignées TgGasp-2.2 (n-5), TgGasp-2.9 (n=3) et sauvages FVB (n=4) ont été réalisées afin de quantifier l'aire des fibres musculaires. Les coupes ont été marquées avec un anticorps ciblant la laminine afin de permettre l'observation des parois des fibres musculaires par fluorescence (l'anticorps utilisé est lié à un fluorochrome excitable à la longueur d'onde de 556 nm et réémettant à la longueur d'onde de 573 nm). Chacune des coupes a été observée au microscope à fluorescence au grossissement 10 à plusieurs reprises afin d'avoir une vue d'ensemble du muscle. Le gastrocnémien étant un muscle hétérogène (des petites fibres musculaires cohabitent avec de grosses fibres musculaires), il a été photographié 36 fois. Le soleus et le tibialis anterior étant plus homogène, ils ont été photographiés 24 fois.

Les coupes de muscles ont été observées au microscope à fluorescence et photographiés. Les différentes photographies ont ensuite été analysées avec ImageJ afin de calculer l'aire des fibres musculaires. Pour chacun des trois muscles étudiés, la moyenne des aires des fibres musculaires a été établie (***tableau 13*** et ***figures 30 et 31***).

ID souris	Gastrocnémien (moyenne)	Soleus (moyenne)	Tibialis anterior (moyenne)
FVB_1	4459± 783	3513±207	3835±273
FVB_2	3997±1019	3566±187	3233±266
FVB_3	4187±635	3163±159	3740±280
FVB_4	4503±1411	ND	3780±308
TgGasp-2.2_1	4898±980	3118±160	5995±558
TgGasp-2.2_2	5277±1365	4293±210	5240±509
TgGasp-2.2_3	ND	4086±241	5783±514
TgGasp-2.2_4	5096±1375	4436±231	6095±286
TgGasp-2.2_5	5508±1087	4105±291	5780±223
TgGasp-2.2_6	5084±1011	ND	6129±313
TgGasp-2.9_1	5626±884	4674±205	5992±357
TgGasp-2.9_2	5180±997	4656±251	7441±1195
TgGasp-2.9_3	5830±1616	4597±318	5274±454

Tableau 13 : Aire moyenne des fibres musculaires par individu et par muscle

À 12 semaines, les souris TgGasp-2 sont caractérisées par une hypertrophie des fibres musculaires au niveau du gastrocnémien, du soleus et du tibialis anterior. Comparées aux souris sauvages, les souris TgGasp-2.2 voient :

- au niveau du gastrocnémien, l'aire de leurs fibres musculaires augmentée de 20%,
- au niveau du soleus, l'aire de leurs fibres musculaires augmentée de 17%,
- au niveau du tibialis anterior, l'aire de leurs fibres musculaires augmentée de 60%.

Comparées aux souris sauvages de fond génétique FVB, les souris TgGasp-2.9 voient :

- au niveau du gastrocnémien, l'aire de leurs fibres musculaires augmentée de 30%,
- au niveau du soleus, l'aire de leurs fibres musculaires augmentée de 35%,
- au niveau du tibialis anterior, l'aire de leurs fibres musculaires augmentée de 70%.

La tendance à l'augmentation de la masse musculaire relative du tibialis antérieur observée chez les deux lignées TgGasp-2 est nettement confirmée par la mesure de l'hypertrophie musculaire du tibialis anterior.

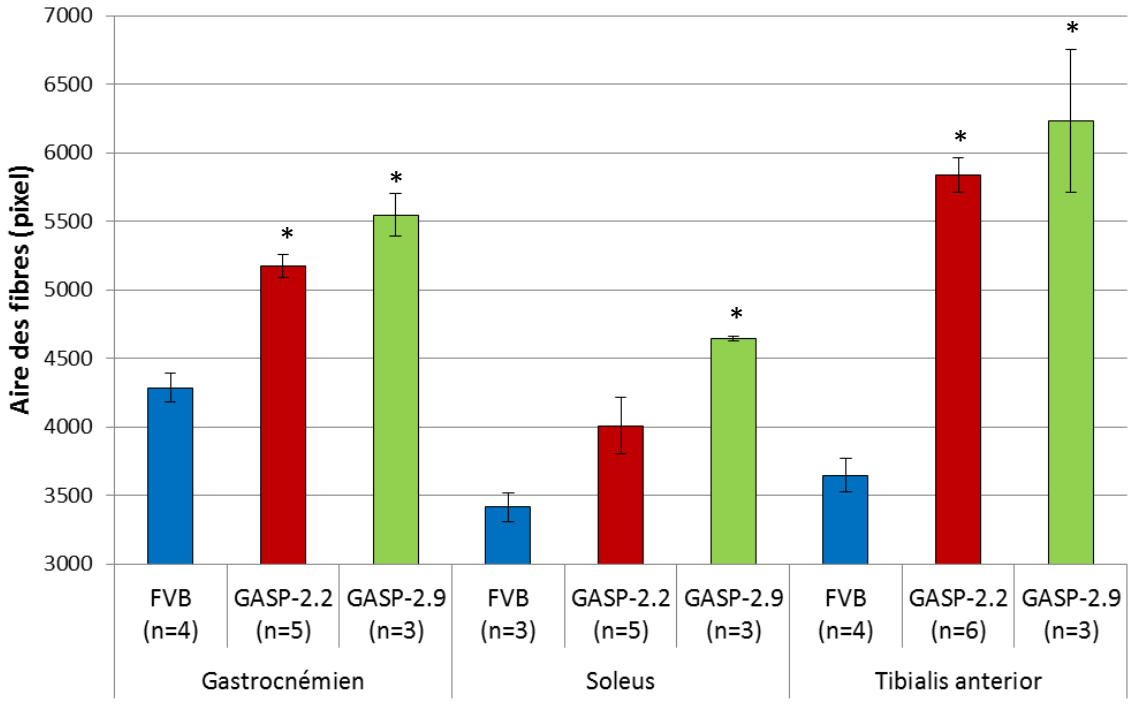


Figure 30 : Aire moyenne des fibres musculaires

*Les fibres musculaires des muscles (gastrocnémien, soleus et tibialis anterior) de chaque individu (en moyenne 12) appartenant aux lignées murines TgGasp-2.2, TgGasp-2.9 et souris sauvages FVB ont été photographiées respectivement (36, 24, 24) fois, donnant un échantillon d'environ 1 000 photographies (~[(36+24+24)*12]) .*

*Pour chaque cliché, l'analyse avec ImageJ a permis d'établir la mesure de l'aire moyenne des fibres musculaires. Ainsi, pour chaque muscle et lignée étudié, l'aire moyenne des fibres musculaires a été calculée par la compilation des mesures de tous les clichés les concernant. Les barres d'erreurs correspondent au SEM. n = nombre d'individus analysés par lignée. Le test non paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé. Selon ce test et avec un risque α de 5 %, pour tous les muscles, les groupes composés des souris issues des lignées TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9 différent du groupe composé des souris issues de la lignée sauvage FVB. Seul le groupe correspondant à la lignée TgGasp-2.2, pour le soleus, n'est pas significativement différent du groupe correspondant aux souris issues de la lignée sauvage FVB. Cela s'explique bien par le fait que la souris TgGasp-2.2 3873 est caractérisée au niveau du soleus par une aire moyenne de fibres musculaires inférieure à celle mesurée chez les souris issues du groupe FVB. Pour augmenter la robustesse des résultats, il faudra augmenter l'échantillonnage. * : p-value inférieure à 0.05.*

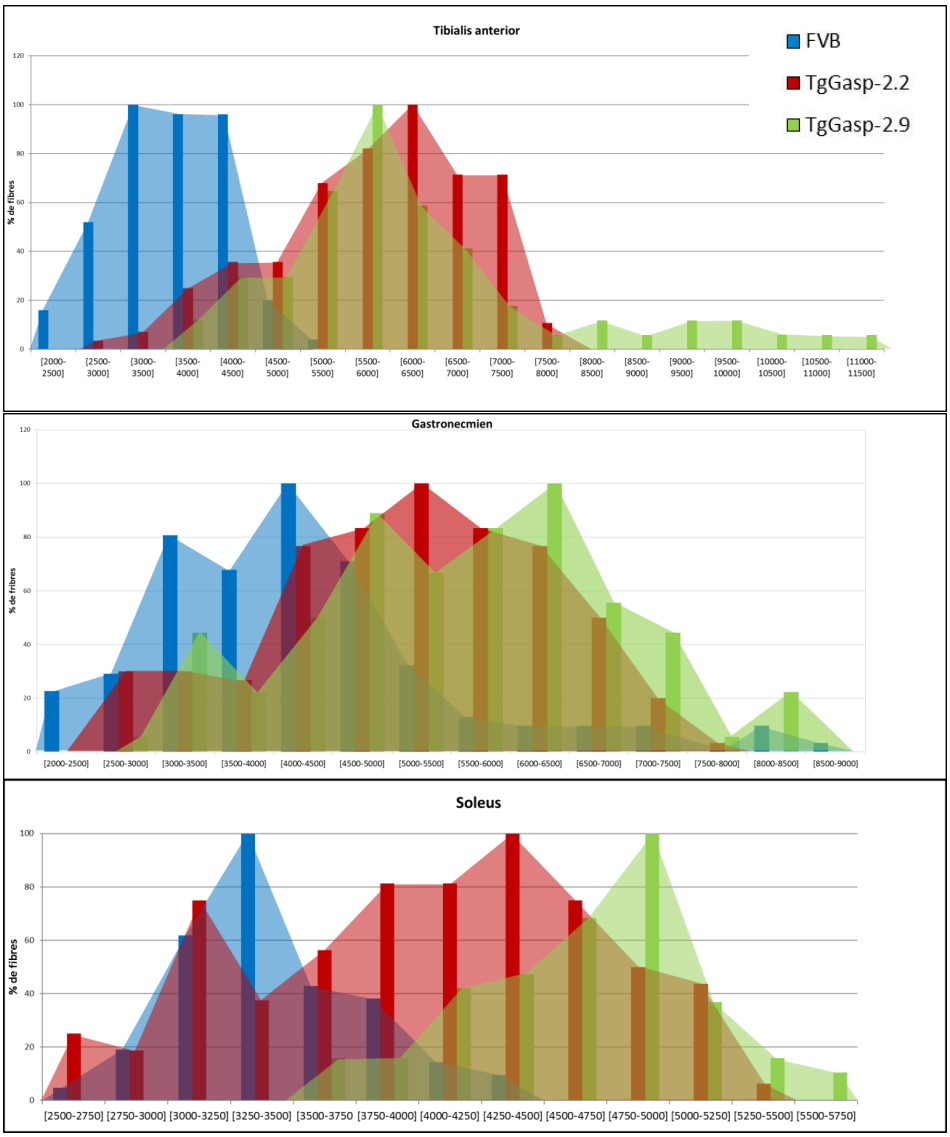


Figure 31 : Distribution de l'aire des fibres musculaires

Les trois histogrammes correspondent à la répartition des fibres musculaires en fonction de leur aire. Les données utilisées correspondent à la moyenne de l'aire des fibres musculaires mesurées pour chaque photographie. L'axe des ordonnées correspond à un % de fibres musculaires. Pour une lignée donnée, ce pourcentage est calculé en attribuant la valeur de 100% à la fourchette de l'aire ayant le plus de représentants. Ainsi, par exemple, si pour une lignée donnée, la fourchette de l'aire [5500-6000] a le plus de représentants et que le nombre de représentants soit de 20 alors ce nombre sera multiplié par 5 pour obtenir 100% et le nombre de représentants de chaque fourchette de l'aire sera aussi multiplié par 5. Pour une autre lignée, si ce nombre maximum de représentant vaut 40, alors le nombre de représentant de chaque fourchette de l'aire sera multiplié par 2.5. Ainsi, bien que les lignées n'aient pas le même nombre d'individus, l'amplitude des courbes sera la même. Pour les trois muscles, on voit clairement que la répartition de la moyenne des fibres musculaires suit une loi normale et un décalage dans cette répartition est nettement observé quand les souris TgGasp-2 sont comparées aux souris sauvages FVB. De plus, le décalage observé dans la répartition des fibres musculaires est similaire à l'augmentation de l'aire moyenne des fibres musculaires par muscle et par lignée. Ceci est particulièrement flagrant avec le TA où un décalage est clairement obervé entre la lignée FVB et les lignées TgGasp-2.

Les muscles squelettiques sont des muscles hétérogènes, en type de fibre mais aussi en taille de fibre. Pour visualiser d'avantage l'hypertrophie musculaire observée dans les trois muscles étudiés dans les deux lignées TgGasp-2, une étude de la distribution des fibres par rapport à des groupes croissants d'aire de fibre a été réalisée (***figure 31***). Ceci permet de s'affranchir d'une moyenne globale de l'aire des fibres et permet la visualisation de la répartition des fibres dans les deux lignées transgéniques par rapport aux souris sauvages. A 12 semaines, les souris TgGasp-2 sont clairement caractérisées par un décalage de la répartition du nombre de fibre dans le sens d'une augmentation en taille, au niveau du gastrocnémien, du soleus et du tibialis anterior par rapport aux souris sauvages.

Mesure de l'hyperplasie musculaire

En parallèle, nous avons calculé le nombre de fibres pour le soleus, le gastrocnémien et le tibialis anterior. Dans le cas du soleus, nous avons réalisé un comptage manuel de chaque fibre composant le muscle (***figure 32***). Pour obtenir un nombre le plus juste possible, pour chaque animal, nous avons analysé six coupes entières de muscle et moyenné les valeurs obtenues. Pour les deux autres muscles, à cause du nombre très important de fibres musculaires (supérieur à 12 000), nous avons mesuré l'aire totale du muscle et calculé le nombre de fibres en la divisant par l'aire moyenne des fibres calculée précédemment. Cela a été rendu possible car nous avons utilisé les mêmes animaux pour la mesure de l'hypertrophie et de l'hyperplasie.

De la même façon que précédemment, six coupes entières de muscles sont analysées par individu. Comme le montre, le ***tableau 14***, il n'y a pas de différence significative entre les individus FVB et les individus TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9 pour ces trois muscles à l'âge de 12 semaines. Ainsi la sur-expression de *Gasp-2* n'est pas associée à une hyperplasie des fibres musculaires.

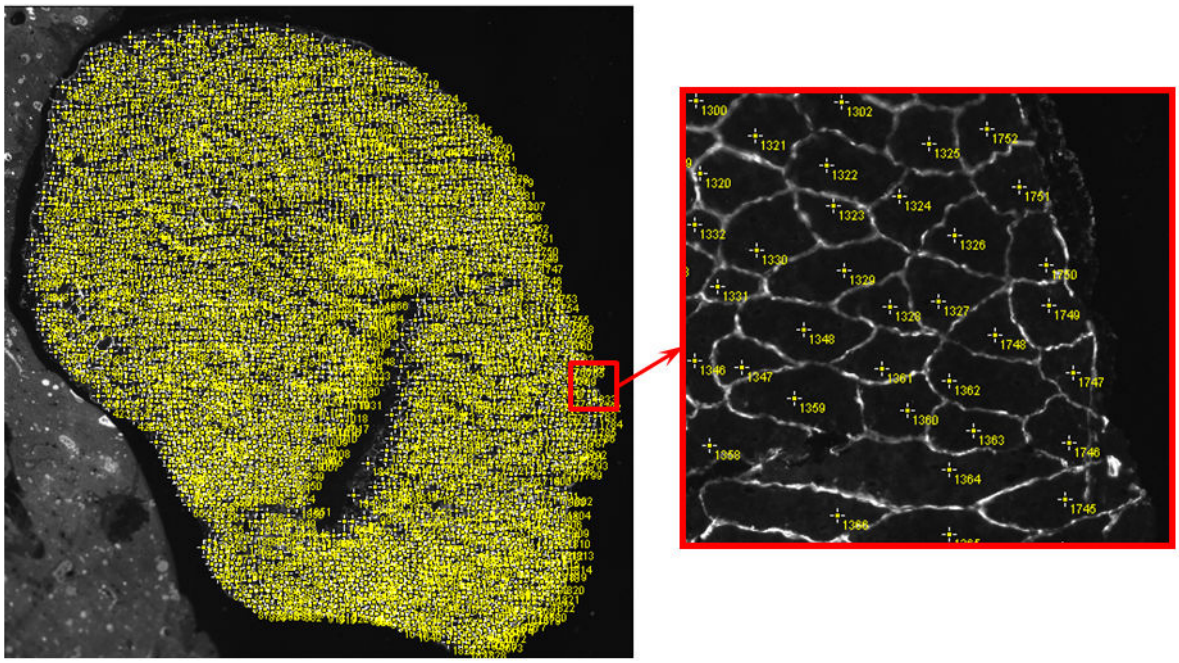


Figure 32 : Comptage manuel du nombre de fibres du soleus

À l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ, toutes les fibres du soleus ont été comptées (soit environ 3 000 fibres) pour un total de 6 coupes transversales de muscle par animal.

Soleus			Tibialis anterior			Gastrocnémien		
TgGasp-2.2 (n=5)	TgGasp-2.9 (n=3)	FVB (n=3)	TgGasp-2.2 (n=6)	TgGasp-2.9 (n=3)	FVB (n=4)	TgGasp-2.2 (n=5)	TgGasp-2.9 (n=3)	FVB (n=4)
1 529 ± 114	**1 715 ± 153**	**1 848 ± 251**	**11 097 ± 1 026**	**12 172 ± 2 129**	**12 742 ± 1 741**	**27 928 ± 4 452**	**30 090 ± 2 382**	**32 894 ± 1 421**

Tableau 14 : Nombre de fibres musculaires par muscle

Ce tableau représente le nombre de fibres musculaires contenu dans le soleus, le tibialis anterior et le gastrocnémien et qui a été mesuré chez certains individus des lignées TgGasp-2.2, TgGasp-2.9 et sauvage de fond génétique FVB. Le test non paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé. Selon ce test, le nombre de fibres musculaires chez ces trois lignées ne varie pas significativement.

À 12 semaines, les souris TgGasp-2 ne sont donc pas caractérisées par une hyperplasie des fibres musculaires au niveau du gastrocnémien, du soleus et du tibialis anterior par rapport aux souris sauvages.

Typage des fibres

Par la suite, nous avons voulu regarder si la sur-expression de GASP-2 entrainait ou non une modification de la composition en fibres d'un muscle. À partir de coupes du muscle gastrocnémien d'animaux âgés de 12 semaines, nous avons effectué un typage des fibres musculaires ***(tableau 15)***. Nous observons une diminution du nombre de fibres de type IIA-IIX chez les individus des deux lignées TgGasp-2 qui apparait significativement différente chez la lignée TgGasp-2.9. Ces résultats demandent à être confirmés et nécessitent d'augmenter le nombre d'animaux. En effet, il y a une très grande variabilité entre les individus qui est due en partie à la technique d'analyse utilisée où le seuillage des fibres positives, négatives ou intermédiaires pour chaque marquage est réalisé manuellement.

Type de fibres (%)	Type-I	Type-I-IIA	Type-IIA	Type-IIA-IIX	Type-IIX	Type-IIX-IIB	Type-IIB	ND
Vitesse de contraction	lent		intermédiaire		rapide		rapide	
FVB (n = 4)	16,5 ± 23,8	50,4 ± 20,5	11,4 ± 4,8	13,0 ± 5,4	0,0 ± 0,0	8,6 ± 6,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Gasp-2.2 (n = 3)	5,7 ± 6,2	71,4 ± 7,8	9,28 ± 4,4	6,8 ± 1,0	0,0 ± 0,0	6,8 ± 1,2	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2
Gasp-2.9 (n = 4)	17,2 ± 24,0	61,4 ± 20,85	9,9 ± 2,3	3,0 ± 1,5	0,0 ± 0,0	8,4 ± 7,6	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2

Tableau 15 : Composition des muscles selon le type de fibres musculaires

Nous observons une diminution du nombre de fibres de type IIA-IIX chez les individus TgGasp-2 qui apparait significativement différente chez la TgGasp-2.9. Les fibres de type I-IIA sont intermédiaires entre les fibres de type I et les fibres de type IIA, les fibres de type IIA-IIX sont intermédiaires entre les fibres de type IIA et les fibres de type IIX, les fibres IIX-IIB sont intermédiaires entre les fibres de type IIX et les fibres de type IIB. ND : fibres non déterminées.

Activités enzymatiques

Pour aller plus loin dans l'analyse musculaire, nous avons mesuré l'activité globale de la LDH (mesure du métabolisme anaérobique) et de l'ICDH (mesure du métabolisme aérobique) à partir d'extraits des quadriceps d'animaux âgés de 12 semaines. Nous n'avons observé aucune différence significative par rapport aux animaux contrôles pour les activités de la LDH et de l'ICDH (***figure 33***) contrairement aux résultats obtenus pour la lignée TgGasp1-20 et la lignée Mstn-/- pour lesquelles nous avons observé une diminution de l'activité de l'ICDH de 20% et de plus de 50% respectivement. Comme les fibres lentes sont caractérisées par un métabolisme oxydatif/aérobique, la diminution de l'activité de l'ICDH observée chez les souris TgGasp-1.20 et les souris Mstn-/- suggère que ces souris sont caractérisées par une diminution du nombre de fibres lentes de type I.

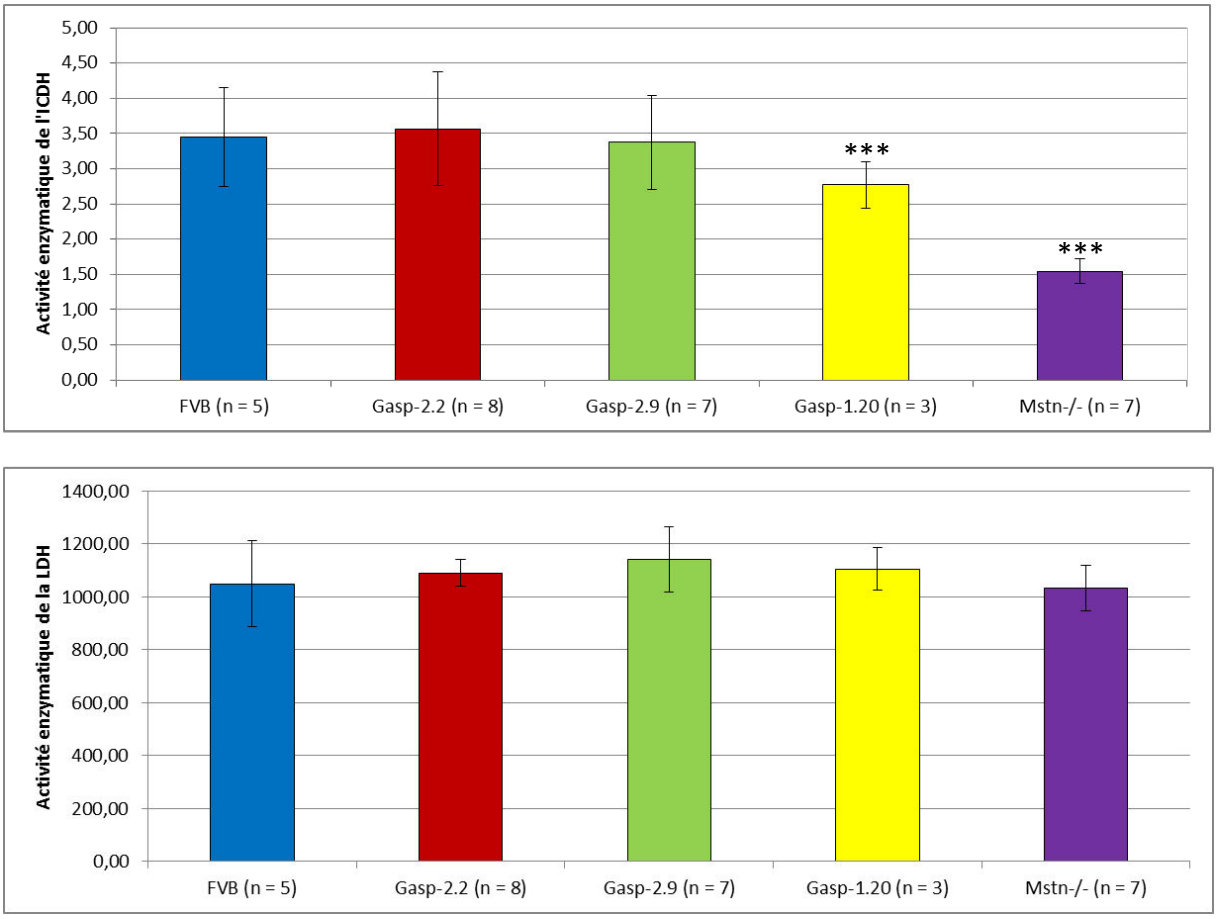


Figure 33 : Mesure de l'activité enzymatique musculaire

Nous observons une diminution significative du métabolisme aérobie (mesure de l'activité de l'ICDH) de l'ordre de 20% entre la lignée TgGasp-1.20 et la lignée FVB. De même nous observons une diminution significative du métabolisme aérobie de l'ordre de 50% entre la lignée Mstn-/- et la lignée FVB.

*En ce qui concerne les individus TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9, nous n'avons pas observé de différence significative dans le métabolisme aérobie (mesure de l'activité de l'ICDH) et le métabolisme anaérobie (mesure de l'activité de la LDH). *** : p-value inférieure à 0.001.*

1.3.3. Variation phénotypique du tissu adipeux

Les souris knock-out pour la myostatine sont caractérisées par une réduction de la masse adipeuse (Zhang *et al.*, 2012). Il est donc intéressant d'étudier la masse adipeuse chez les souris des lignées TgGasp-2 (***figure 34***).

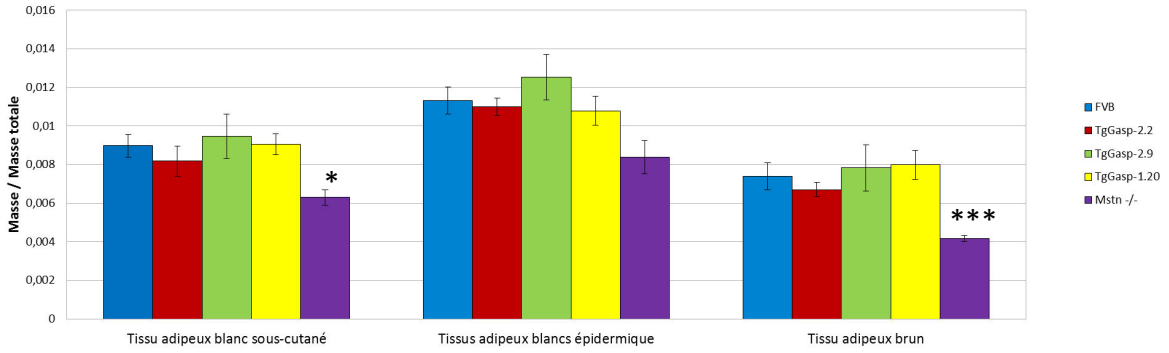


Figure 34 : Estimation de la masse du tissu adipeux

Des souris âgées de 12 semaines des lignées TgGasp-2 (n=5), , TgGasp-2.9 (n=5), FVB (n=10), TgGasp-1.20 (n=6) et Mstn-/- (n=4) ont été sacrifiées afin de mesurer la masse totale des souris et la masse du tissu adipeux. Ainsi, les adipocytes du tissu adipeux blanc sous-cutané, les adipocytes blancs épidermiques et les adipocytes du tissu adipeux brun ont été prélevés chez ces souris. Les différents tissus adipeux ont ensuite été pesés. Les barres d'erreurs correspondent au SEM soit à l'écart-type divisé par la racine de l'effectif.

Le test non paramétrique de Mann et Whitney a été utilisé.

La masse des tissus adipeux prélevés a été normalisée avec la masse totale de l'individu à partir du tissu adipeux a été prélevé. Le ratio masse du tissu adipeux / masse totale ne diffère pas significativement entre les deux lignées TgGasp-2 et la lignée FVB, ainsi qu'entre la lignée TgGasp-1.20 et la lignée FVB. Seule la lignée Mstn -/- diffère significativement de la lignée FVB pour les adipocytes blancs sous-cutanés et les adipocytes bruns. Au niveau des adipocytes blancs épidermiques, le ratio masse du tissu adipeux / masse totale ne diffère pas significativement de celui de la lignée FVB mais la même tendance à la baisse est observée pour les trois tissus adipeux prélevés.

** : p-value inférieure à 0.05, ** : p-value inférieure à 0.01, *** : p-value inférieure à 0.001.*

Les résultats indiquent que les souris des lignées TgGasp-2 et TgGasp-1, âgées de 12 semaines, ne sont pas caractérisées par une diminution spécifique de la masse adipeuse comme ce qui est observé avec les souris knock-out pour la myostatine.

2. Étude *in silico* du rôle de la protéine GASP-1

Afin de voir les conséquences apportées par la sur-expression de GASP-1 dans notre modèle TgGasp-1, une étude transcriptomique et protéomique ont été réalisées.

2.1. Analyse transcriptomique des cellules primaires en différenciation

Des lignées de myoblastes primaires avaient été auparavant générées au laboratoire (Brun *et al*., 2014). Ces lignées cellulaires ont été appelées cellules S20 et cellules FVB et ont été générées à partir des cellules satellites de souris issues de la lignée TgGasp-1.20 et de souris sauvages FVB (Brun *et al*., 2014).

Ces deux lignées cellulaires ont été mises en culture et une fois arrivées à 80% de confluence, elles ont été mises en différenciation par déplétion en sérum (0h de différenciation). Les ARNm ont été extraits à 0h, 12h et 24h de différenciation. Seules les cellules S20 ont été cultivées en duplicat. Les échantillons d'ARNm ont été appelés m1 0h, m1 12h, m1 24h, m2 0h, m2 12, m2 24h, s 0h, s 12h et s 24h. Ces neuf échantillons d'ARNm ont été rétrotranscrits en ADNc et hybridés sur des puces à ADN à l'institut Cochin. Les données obtenues ont été analysées grâce à plusieurs modules de bioinformatique (**ExpressionFileCreator** et **CollapseDataset**) et ont permis d'établir une liste de 3000 gènes sous- ou sur-exprimés pour les trois temps de différenciation ***(figure 35)***.

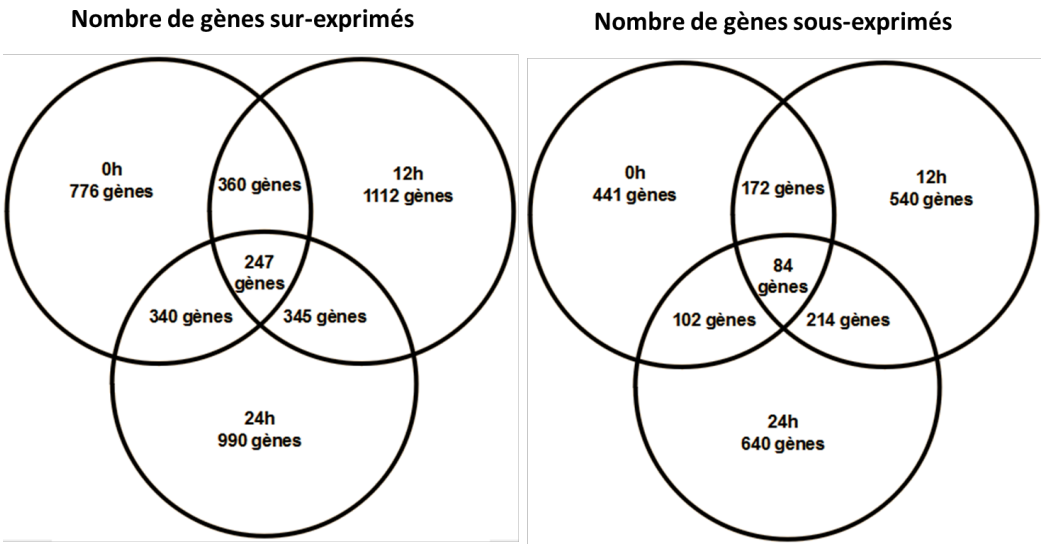


Figure 35 : Diagramme de Venn représentant les gènes différentiellement exprimés selon le stade de différenciation.

Pour chaque temps de différenciation, les gènes sous- et sur-représentés ont été utilisés pour réaliser un enrichissement par gene ontology avec le site **WebGestalt** (***tableau 16, annexe 3***).

0h de différenciation	12h de différenciation	24h de différenciation
Angiogenesis	Angiogenesis	Blood vessel morphogenesis
Blood vessel morphogenesis	Blood vessel morphogenesis	Angiogenesis
Blood vessel development	Blood vessel development	Blood vessel development
Vasculature development	Vasculature development	Vasculature development
Circulatory system development	Circulatory system development	DNA-dependent DNA replication
Cardiovascular system development	Cardiovascular system development	Chromosome segregation
Muscle system process	Cytoskeleton organization	M phase of mitotic cell cycle
Muscle structure development	Cell adhesion	DNA replication
Regulation of muscle system process	Biological adhesion	Nuclear division
Muscle contraction		Mitosis
Regulation of cell adhesion		Organelle fission
Response to wounding		Cell division
Regulation of anatomical structure morphogenesis		M phase
Urogenital system development		Cell cycle phase
		Microtubule cytoskeleton organization
		Mitotic cell cycle
		Cell cycle process
		Regulation of cell cycle process
		Cell cycle

Tableau 16 : Les processus biologiques les plus affectés par la sur-expression de GASP-1 durant la différenciation des myoblastes primaires S20

Ce tableau regroupe les processus biologiques les plus enrichis lors de l'enrichissement par gene ontology et dont la p-value est la plus faible (inférieur à 1E-10). Les processus biologiques apparentés ont été associés à une même couleur. Angiogenèse (violet) ; développement musculaire (orange) ; adhésion cellulaire (bleu ciel) ; réponse aux blessures (jaune) ; régulation de la morphogenèse des structures anatomiques (vert) ; Développement du système urogénital (turquoise); Organisation du cytosquelette (marron) ; Cycle cellulaire (rouge).

Ces processus biologiques ont été utilisés pour constituer une liste de gènes (plus de 600 gènes) appartenant à ces processus biologiques et dont l'expression est altérée par la sur-expression de GASP-1 (***annexe 4***). Une recherche bibliographique a été réalisée sur cette liste de 600 gènes afin de permettre l'identification des gènes déjà associés aux muscles et 11 gènes ont été sélectionnés (Cd36, Mfap5, Myh4, Myh7, Myh2, Myh1, Fabp4, Fabp3, Serpine1, Mmp2 et Emcn) (***tableau 17***).

Gène	chromosome	Ratio à 0 h	Ratio à 12 h	Ratio à 24 h
CD36/fatty acid translocase	5	0.11	0.2	0.37
Mfap5/MAGP-2	6	5.74	4.76	5.27
Myh4/MyHC IIb	11	0.18	0.14	0.13
Myh7/MyHC-I	14	0.21	0.44	0.67
Myh2/MyHC-IIa	11	0.3	0.38	0.59
Myh1/MyHC-IIx	11	0.18	0.42	0.75
Fabp4/fatty acid binding protein 4	3	6.89	8.04	12.41
Fabp3/ fatty acid binding protein 3	4	0.48	0.51	0.91
Serpine1/Plasminogen activator inhibitor-1/PAI-1	5	6.3	5.03	3.51
Mmp2	8	2.73	2.62	3.16
Emcn/endomucin/Muc14	3	48.87	50.05	46.04

Tableau 17 : Ratio de sous- et sur-expression des onze gènes sélectionnés

Ces gènes ont été sélectionnés selon deux critères : (i) sous- ou sur-exprimés dans les cellules S20 par rapport aux cellules FVB et (ii) être impliqué dans des processus musculaires selon la littérature. Emcn fait figure d'exception car il n'est pas associé à un processus musculaire selon la littérature mais sa forte sur-expression dans les cellules S20 le rend intéressant à étudier.

Afin de confirmer les résultats de l'analyse transcriptomique, une approche par PCR quantitative SybrGreen a été entreprise, le but étant de confirmer la sous ou sur-expression de ces onze gènes.

Dans cette optique, plusieurs paires d'amorces ont été conçues par Primer blast et selon plusieurs critères :

- la taille de l'amplicon devait être comprise entre 100 et 200 pb.
- les amorces devaient être situées de part et d'autre d'un intron afin que de l'ADN génomique ne puisse pas être amplifié
- les structures secondaires devaient être évitées (le site Oligocalc permet de vérifier la présence ou l'absence de structure secondaire au niveau des amorces).

Les différentes amorces ont ensuite été vérifiées par PCR (amplicon à la taille attendue et pas d'amplification aspécifique) et PCR quantitative (présence ou absence d'amplifications aspécifiques, de dimères d'amorces et test de l'efficacité des amorces). Sur les onze gènes, seules cinq paires d'amorces avec une efficacité convenable ont été conçues (***tableau 18***). Pour les autres gènes, malgré le fait que plusieurs paires d'amorces par gène ont été conçues et testées, cette efficacité n'a jamais été suffisante.

Amorces Sybrgreen				
	Amorce		Taille attendue	Efficacité
Fabp4	F	Fabp4F : 5'-CTT CAA ACT GGG CGT GGA A-3' (Tm 58,29)	182 pb	91,11%
	R	Fabp4R : 5'-AAG TCA CGC CTT TCA TAA CAC-3' (Tm 56,83)		
Myh1	F	Myh1F : 5'-CGC TCG AAG TTG CAT CCC TAA-3' (Tm 60,74)	151 pb	102,00%
	R	Myh1R : 5'-TGT TCT GAG CCT CGA TTC GC-3' (Tm 60,46)		
Emcn	F	EmcnF : 5'-ATG GAA CAC CTC CCG AAG GA-3' (Tm 60,65)	199 pb	104,00%
	R	EmcnR : 5'-TGG GAA CCT GGT AGC GTT GA-3' (Tm 61,12)		
Mfap5	F	Mfap5F : 5'-ACC TTC CAC AGA TGA CCT AGC-3' (Tm 59,17)	280 pb	92,36%
	R	Mfap5R : 5'-ACA GGG AGG TCG GAA GT-3' (Tm 56,47)		
Myh7	F	Myh7F : 5'-TCC TGC TGT TTC CTT ACT TGC TA-3' (Tm 59,67)	101 pb	102,00%
	R	Myh7R : 5'-TGA TAG AGA GGT AAG CCC AGG-3' (Tm 58,04)		

Tableau 18 : Liste des amorces SybrGreen présentant une efficacité suffisante

Sur les onze gènes, seules cinq paires d'amorces ont été conçues avec une efficacité suffisante.

2.2 Identification des protéines différentiellement exprimées (TgGasp-1.20 vs FVB)

Dans l'objectif de compléter l'analyse transcriptomique et d'identifier les voies de signalisation modifiées par la sur-expression dela protéine GASP-1, nous avons étudié le profil d'expression des protéines du quadriceps entre des souris TgGasp1.20 et des souris contrôles FVB âgées de 3 et 12 semaines par électrophorèse bidimensionnelle quantitative. A l'âge de 3 semaines, nous avons détecté de 857 spots protéiques pour les deux génotypes. L'analyse d'images a permis de révéler 21 spots protéiques significativement variants (***figure 36A***) avec un ratio supérieur ou égal à 1,2 (test de Student avec p-value < 0,05). L'identification des protéines par spectrométrie de masse est listée dans le ***tableau 19***. En ce qui concerne l'analyse avec les animaux âgés de 12 semaines, 1469 spots protéiques ont également été détectés ; 19 spots présentent des différences de ratio protéique entre les deux génotypes testés statistiquement significatifs (***figure 36B***). Ces protéines identifiées sont présentées dans le ***tableau 19***. Parmi les protéines exprimées différentiellement, PSME-1, protéine du protéasome, est sous-exprimée chez les TgGasp-1.20. Cette protéine pourrait être associée au phénotype d'obésité et de résistance à l'insuline identifié chez ces animaux. En effet, une accumulation de protéines polyubiquitinilées par dysfonctionnement du protéasome pourrait entrainer un stress du réticulum endoplasmique conduisant à une insulino-résistance. D'autres protéines identifiées semblent être impliquées dans ces mêmes phénotypes. C'est le cas de GRP78 sur-exprimée chez les TgGasp-1.20 à l'âge de 12 semaines pour laquelle nous avons voulu confirmer les résultats de l'analyse 2D par western Blot, comme le montre la ***figure 37***. Cette analyse révèle une variation aussi une variation de certaines myosines et de protéines du métabolisme oxydatif. L'ensemble de ces résultats est à compléter avec des analyses enzymatiques du tissu musculaire.

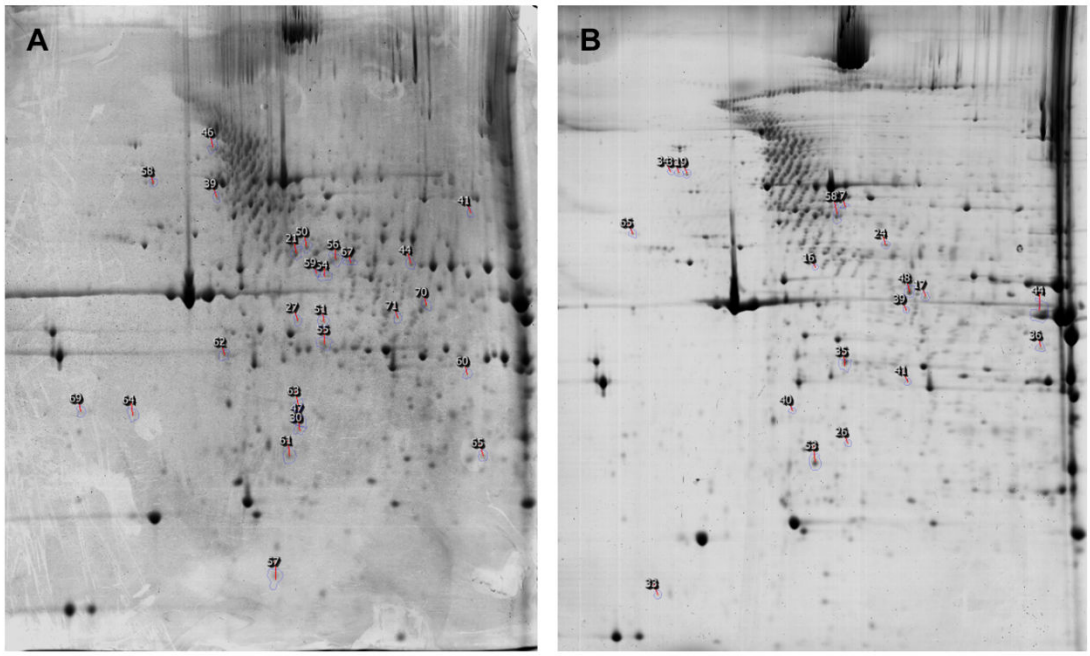


Figure 36 : Photographies de deux gels bidimensionnels réalisés à partir d'extraits protéiques issus de quadriceps prélevés chez les lignées TgGasp-1.20 et FVB

*Les quadriceps de souris des lignées TgGasp-1.20 et FVB âgées de 3 semaines **(A)** ou 12 semaines **(B)** sont prélevés et leurs protéines sont extraites. Ces protéines sont séparées par gel bidimensionnel en fonction de leur pHi et de leur taille.*

Les gels sont scannés et les images 2D issues du protéome musculaire de la lignée TgGasp-1.20 sont comparées avec celles issues de la lignée FVB. Les données sont exprimées en ratio correspondant au volume (intensité X surface) d'un spot protéique issu de la carte protéique TgGasp-1.20 sur le volume du même spot issu de la carte protéique FVB.

Protéines variantes à 3 semaines					
N° Spot	Ratio Tg/FVB	T-test	Puissance	Access Number	Voie Métabolique
21	-1,9	0,025	0,6612	MYH4_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
				MYH1_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
27	-1,8	0,01	0,8168	IDH3A_MOUSE	cycle KREBS process carbohydrate (oxydoreductase) -marqueur du métabolisme oxydatif- mitochondrie
30	-1,8	0,011	0,8036	ACTS_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
39	-1,7	0,042	0,5570	MYH4_MOUSE	
41	-1,6	0,041	0,5615	CES3_MOUSE	process acyl-CoA - RE
				APOH_MOUSE	liaison héparine (réponse inflammatoire) - secrété (plasma)
44	-1,5	0,017	0,7339	ENOA_MOUSE	dégradation carbohydrate, glycolyse - cytoplasme et membrane cellulaire interaction HSP70, cardiomyopathie diabétique
46	-1,5	0,036	0,5886	MYH4_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
47	-1,5	0,005	0,8883	PSME1_MOUSE	régulation de l'activité du protéasome (immunoprotéasome) - cytosol
50	-1,5	0,025	0,6589	MYH4_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
51	-1,5	0,007	0,8526	MYH4_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
54	-1,4	0,011	0,8075	MYH4_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
55	-1,4	0,029	0,6301	MYH4_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
56	-1,4	0,012	0,7934	MYH4_MOUSE	protéines structure - cytosquelette
				PRS7_MOUSE	
57	1,4	0,015	0,7563	HSPB6_MOUSE	réponse au stress - cytoplasme/noyau
58	1,4	0,018	0,7220	A2AUC9_MOUSE	
61	-1,3	0,016	0,7377	SPRE_MOUSE	biosynthèse tetrahydrobiopterine - cytoplasme
				HSPB1_MOUSE	reponse au stress - cytoplasme/cytosquelette/noyau
62	-1,3	0,02	0,7044	PP2AA_MOUSE	méiose, développement du mésoderme, déphosphorylation des protéines, régulation cycle cellulaire - noyau, cytoplasme etc…
64	-1,3	0,048	0,5316	MYH3_MOUSE	
65	-1,3	0,044	0,5465	CN166_MOUSE	organisation des microtubules - noyau/cytoplasme/cytosquelette
67	-1,3	0,021	0,6960	ENOA_MOUSE	dégradation carbohydrate, glycolyse - cytoplasme et membrane cellulaire
				DNJA2_MOUSE	chaperonne (ATPase, HSP, ion métallique) - membrane
				ODO2_MOUSE	cycle acide tricarboxylique - mitochondrie
				KERA_MOUSE	protéines de la matrice extracellulaire
69	-1,2	0,045	0,5425	ABEC2_MOUSE	déméthylation ADN, modification ARNm (uniquement dans cœur et musque squelettique)
70	-1,2	0,04	0,5691	MYH4_MOUSE	
				NDUAA_MOUSE	chaîne respiratoire, transport électron - mitochondrie
71	-1,2	0,044	0,5501	MDHC_MOUSE	cycle acide tricarboxylique - cytoplasme
				IDH3A_MOUSE	process carbohydrate (oxydoreductase) -mitochondrie

Protéines variantes à 12 semaines					
N° Spot	Ratio Tg/FVB	T-test	Puissance	Access Number	Voie Métabolique /localisation
14-16	2	0,003	0,9240	MYH4_MOUSE	contraction muscle
14-17	-2	0,009	0,8109	ODPA_MOUSE	pyruvate déshydrogénase - mitochondrie
				MYH3_MOUSE	contraction muscle
14-19	1,9	0,012	0,7744	GRP78_MOUSE	translocation des protéines aberrantes RE dégradées par protéasome, protéine abondante conditions de croissance
14-24	-1,7	0,015	0,7379	TRI72_MOUSE	exocytose - membrane de vésicule cytoplasmique - spécifique muscle cardiaque et squelettique
14-26	-1,7	0,008	0,8362	PSME1_MOUSE	régulation de l'activité du protéasome (immunoprotéasome) - cytosol
14-27	-1,6	0,046	0,5364	MYH1_MOUSE	protéine de structure - cytosquelette
14-31	1,6	0,009	0,8190	GRP78_MOUSE	translocation des protéines aberrantes RE dégradées par protéasome, protéine abondante conditions de croissance
14-33	1,6	0,032	0,6048	MLRV_MOUSE	protéine de structure - cytosquelette
14-34	1,6	0,003	0,9177	GRP78_MOUSE	
14-35	-1,6	0,017	0,7178	LDHB_MOUSE	glycolyse (lactate en pyruvate) - cytoplasme
14-36B	-1,6	0,041	0,5589	TNNT3_MOUSE	protéine de structure - cytosquelette
14-36H	-1,6	0,041	0,5589	HIBCH_MOUSE	hydrolase - mitochondrie
				LDHA_MOUSE	fermentation (pyruvate/lactate)- cytoplasme
14-39	-1,5	0,015	0,7388	MYH4_MOUSE	contraction muscle
14-40	-1,5	0,032	0,6072	APOE_MOUSE	cholestérol/apoptose/stress oxydatif etc…secrétée dans plasma
14-41	-1,5	0,029	0,6234	MDHC_MOUSE	oxydoréductase - cycle acide tricarboxylique/ métabolisme carbohydrate - cytoplasme/mitochondrie
				CK054_MOUSE	hydrolase/fixation ions métalliques - noyau
14-44	-1,5	0,044	0,5425	KCRM_MOUSE	activité créatine kinase/ATP binding - cytoplasme
14-48	-1,5	0,029	0,6262	NDUS2_MOUSE	oxydoréductase - transport/chaine respiratoire mitochondriale
14-53	-1,4	1,99E-04	0,9978	NDUS3_MOUSE	oxydoréductase - apoptose - transport/chaine respiratoire mitochondriale
14-58	-1,4	0,046	0,5322	MYH4_MOUSE	contraction muscle
12-65	1,5	0,009	0,8275	PDIA1_MOUSE	catalyse ponts SS chaperonne - isomérase - réticulum endoplasmique

Tableau 19 : Les principales protéines dont l'expression varie entre des souris âgées de 3 ou 12 semaines des lignées TgGasp-1.20 et FVB au niveau du quadriceps

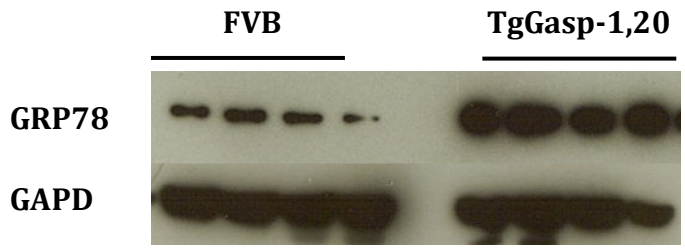


Figure 37 : Expression de GRP78

Immunorévélation par western blot de GRP78 : 20 µg d'extraits protéiques totaux/puits, issus de 4 quadriceps prélevés chez des souris FVB mâles âgés de 12 semaines et issus de 4 quadriceps prélevés chez des souris TgGasp-1.20 ont été déposés afin de mesurer l'expression protéique de GRP78 par western blot. La protéine GAPDH sert de protéine de référence.

Discussion

1. Caractérisation phénotypique de la lignée TgGasp-2

Quatre lignées de souris transgéniques sur-exprimant de façon ubiquitaire GASP-2 ont été établies. Une d'entre elles, la lignée TgGasp-2.1, présentait le plus fort taux d'expression du transgène dans différents tissus dont le muscle. Il n'a cependant pas été possible de stabiliser la lignée à l'état homozygote. De plus, nous avons été confrontés à une perte du transgène au fil des générations et des problèmes de reproduction de la lignée. La lignée TgGasp2.8 quant à elle, n'a pu être maintenue qu'à l'état hétérozygote. Comme la lignée précédente, nous avons eu une perte du transgène au fil des générations. En conséquence, les deux lignées, TgGasp-2.2 et TgGasp-2.9 ont été analysées plus en détail au niveau phénotypique. Elles présentent une sur-expression de *Gasp-2* supérieure à 100 dans les différents tissus étudiés.

Au cours de ce travail, nous avons pu montrer que la sur-expression de *Gasp-2* entraîne une augmentation du poids des souris TgGasp-2 par rapport aux souris sauvages, à 12 semaines. C'est une augmentation significative pour la lignée TgGasp-2.2 et une nette tendance pour la lignée TgGasp-2.9. Cette augmentation du poids est comparable à l'augmentation retrouvée chez les souris TgGasp-1 mais est inférieure au poids des souris knock-out pour la myostatine. Les souris TgGasp-2 montrent aussi une tendance à l'augmentation du poids de certains muscles comme le tibialis anterior et les pectoraux. D'ailleurs, cette tendance se confirme nettement pour ces deux muscles quand la masse musculaire n'est pas normalisée par la masse totale de l'individu ayant fourni le muscle. La manière de prélever le muscle influence aussi cette étude. En effet, il est à noter que le prélèvement du tibialis anterior et l'EDL se fait dans sa totalité puisqu'il est possible de les prélever de tendon à tendon. Pour les autres muscles étudiés, ceci est plus délicat voire impossible.

De plus, les analyses histologiques réalisées sur les muscles gastrocnémien, soleus et tibialis anterior, notamment la mesure de l'hypertrophie, confirme l'augmentation de la masse musculaire observée, surtout pour le tibialis anterior. En effet, l'aire moyenne des fibres musculaires pour ce muscle est entre 60 et 70% plus importante que l'aire mesurée chez les individus FVB. Pour le gastrocnémien et le soleus, cette augmentation est de l'ordre de 20 à 40% et de 15 à 30% respectivement. Il serait intéressant de mesurer l'aire des fibres musculaires des pectoraux afin de vérifier si la tendance à l'augmentation de la masse musculaire de ce muscle se confirme également par la mesure de l'hypertrophie. Dans tous les cas, ces résultats montrent que les souris TgGasp-2 sont caractérisées par une hypertrophie des fibres musculaires qui est visible à 12 semaines.

La mesure du nombre de fibres musculaires réalisée sur les muscles gastrocnémien, soleus et tibialis anterior montre que les individus des lignées TgGasp-2 ne développent pas d'hyperplasie musculaire. Le nombre de fibres se mettant en place avant la naissance, une explication possible à l'absence d'hyperplasie est que le transgène pourrait être faiblement exprimé chez le fœtus. Il est nécessaire de vérifier l'expression du transgène au niveau embryonnaire. Une seconde explication pourrait être l'intervention de l'activine, un autre inhibiteur de la croissance musculaire. En effet, outre la myostatine, l'activine, un autre membre des TGFβ, est également capable d'inhiber la croissance musculaire (Chen et al., 2015 ; Chen et al., 2016). Une des particularités des protéines GASP est qu'elles n'inhibent pas l'activine, contrairement à la follistatine, autre inhibiteur de la myostatine. Les souris sur-exprimant la follistatine présentent une hypertrophie et une hyperplasie des fibres musculaires qui sont la conséquence de l'inhibition combinée de la mystatine et de l'activine (Lee et McPherron, 2001). L'absence d'inhibition de l'activine dans notre modèle pourrait expliquer l'absence d'hyperplasie.

L'hypertrophie et l'hyperplasie sont les deux principales caractéristiques de la croissance musculaire mais une autre caractéristique est à prendre en considération : les différents types de fibres musculaires. C'est un paramètre important car les différents types de fibres ont des rôles distincts dans la stature et l'exercice. Ainsi, un muscle composé majoritairement de fibres de type I sera spécialisé dans les efforts de faible intensité mais demandant une forte endurance et utilisera majoritairement un métabolisme oxydative/aérobique, mesurable par l'activité de l'enzyme ICDH. Un muscle composé majoritairement de fibres de type IIX/IIB sera spécialisé dans les efforts de forte intensité et de courte durée et utilisera majoritairement un métabolisme glycolytique/anaérobique, mesurable par l'activité de l'enzyme LDH. Un muscle composé majoritairement de fibres de types IIA sera intermédiaires entre ces deux types de muscles et pourra réaliser des efforts d'intensité modérée et se fatiguera plus rapidement qu'un muscle composé de fibres de type I. De plus, il utilisera un métabolisme mixte.

L'observation des différents types de fibres musculaires composant le gastrocnémien chez les individus TgGasp-2 et FVB permet de dégager une légère tendance à l'augmentation du nombre de fibres lentes de type I-IIA (intermédiaires entre les fibres de type I et les fibres de type IIA), une légère tendance à la baisse du nombre des fibres de type IIA et une tendance à la baisse du nombre des fibres de type IIA-IIX (intermédiaires entre les fibres de type IIA et les fibres de type IIX) qui est significative pour les individus de la lignée TgGAsp-2.9. Afin de confirmer ou non cette tendance, il sera nécessaire d'augmenter le nombre d'animaux. De

plus, la technique utilisée présente des limites. Les marquages de différentes myosines se font indépendamment et pour chaque marquage, nous devons déterminer les seuils de fluorescence correspondant à des fibres dites intermédiaires ou positives. L'intensité du marquage est coupe et manipulation dépendantes et le seuillage n'est pas automatisable. Une des possibilités est de développer une technique de multiplexage (Bloemberg et Quadrilatero, 2012). D'autres techniques pourraient être développées pour s'affranchir de l'immunohistochimie telle que la microscopie infra-rouge (Astruc *et al*., 2012). La mesure des activités de l'enzyme ICDH (témoin du métabolisme oxydatif/aérobique) et de l'activité de l'enzyme LDH (témoin d'un métabolisme glycolytique/anaérobie) réalisée sur des quadriceps ne montre aucune différence significative. Il serait intéressant de tester ces activités enzymatiques dans d'autres muscles (gastrocnémien, pectoraux,…) mais aussi d'analyser l'activité d'autres enzymes musculaires (créatine phospho-kinase, cyclo oxygénase...). Challenger les souris transgéniques TgGasp-2 en les soumettant à des exercices musculaires variés permettrait également d'évaluer un éventuel switch dans le typage de fibres comme observé dans d'autres modèles transgéniques (da Rocha *et al.*, 2016 ; Matsakas *et al.*, 2012).

Nous avons caractérisé une hypertrophie des fibres musculaires sans hyperplasie chez les souris TgGasp-2 âgées de 12 semaines. Il faut étendre cette étude sur des souris plus jeunes afin de déterminer le stade à partir duquel apparaît le phénotype musculaire. En effet, les travaux du laboratoire ont montré que chez les TgGasp-1.20, l'hypertrophie n'est visible qu'à partir de la 3ème semaine après la naissance (Monestier *et al.*, 2012a). De plus, les travaux de l'équipe de Lee basés sur l'inactivation de Gasp-2 chez la souris montrent un phénotype visible qu'à partir de 6 mois (Lee et Lee, 2013). Il serait donc intéressant de conduire nos analyses chez les souris TgGasp-2 âgées de 6 mois et 1 an afin de voir si de nouveaux phénotypes apparaissent.

D'autres paramètres doivent être également étudiés comme le nombre de noyaux par fibres musculaires ainsi que le nombre de cellules satellites (cellules souches musculaires situées à la périphérie des fibres musculaires). En effet, la croissance musculaire post-natale est due uniquement par l'hypertrophie des fibres musculaires et peut être divisée en deux étapes. Chez la souris, entre la naissance et la troisième semaine de vie, l'hypertrophie est basée sur une augmentation rapide du nombre de noyaux dans la fibre musculaire via l'activation et la fusion des cellules satellites. Cette période est appelée accrétion myonucléaire. Après cette période, les cellules satellites entrent en quiescence et ne contribuent plus qu'à la régénération musculaire. La régulation de la masse musculaire est alors principalement due à la synthèse

protéique et l'hypertrophie a lieu sans addition de nouveaux noyaux (Brun *et al*., 2014). Ainsi, le laboratoire a découvert chez les souris TgGasp-1.20 âgées de 12 semaines que le nombre de noyaux à l'intérieur des fibres musculaires est plus important pour le tibialis anterior et le soleus comparé à la lignée FVB, ce qui suggère qu'une plus haute accrétion myonucléaire contribue à l'hypertrophie observée chez la lignée TgGasp-1.20 (Brun *et al*., 2014). L'étude du nombre de cellules satellites permettra quant-à-elle de déterminer si GASP-2 promeut l'hypertrophie en régulant le nombre de cellules satellites adultes.
Enfin, réaliser différents croisements entre les lignées sur-exprimant *Gasp-1* ou *Gasp-2* avec les souris knock-out pour ces mêmes gènes (par exemple TgGasp-2 x Gasp-1-/-) permettrait d'évaluer la redondance entre ces deux inhibiteurs de la myostatine. GASP-2 est un inhibiteur de GDF11 qui joue un rôle important dans la formation du squelette. Le KO *Gasp-2* entraîne des défauts squelettiques au niveau des lombaires et des modifications des côtes (Lee et Lee, 2013). Pour aller plus loin dans la caractérisation du rôle de GASP-2 dans la formation du squelette, des études sur le phénotype squelettique des souris TgGasp-2 sont en cours.

Le phénotype musculaire des souris TgGasp-2 (hypertrophie sans hyperplasie) est similaire au phénotype musculaire des souris TgGasp-1 (hypertrophie sans hyperplasie) (Monestier *et al*., 2012a) mais il est de plus faible amplitude. Ainsi le gastrocnémien de souris TgGasp-1 âgées de 12 semaines est caractérisé par une augmentation de la masse musculaire de 50% contre 30% pour la lignée TgGasp-2.9. Ceci peut s'expliquer par le fait que GASP-2 est un inhibiteur de la myostatine 100 fois moins puissant que GASP-1 (Walker *et al*., 2015). Cependant, les souris TgGasp-2 et TgGasp-1 diffèrent sur un point. Nous avons montré que chez les TgGasp-1, la myostatine est sur-exprimée probablement via une boucle de retro-contrôle négative passant par SMAD7 (Brun *et al*., 2014), ce qui ne semble pas être le cas pour les souris TgGasp-2 (résultats non publiés).
Comme les TgGasp-1, les souris TgGasp-2 ne présentent pas à 12 semaines une diminution de la masse du tissu adipeux contrairement aux souris Mstn-/- (McPherron et Lee, 2002). Cependant, la sur-expression de GASP-1 entraîne chez les souris âgées de nombreux défauts métaboliques dont une augmentation de la masse graisseuse, une accumulation de gras ectopique, une hyperglycémie, une hyperinsulémie et une insulino-résistance hépatique et musculaire (Périè *et al.*,en révision). Une des hypothèses avancée par le laboratoire pour expliquer l'augmentation de la masse adipeuse observée est l'existence dans cette lignée d'une sur-expression de la myostatine par rétrocontrôle positif. Des études préliminaires du tissu adipeux chez les souris TgGasp-2 âgées renforcent cette hypothèse. En effet, les

individus TgGasp-2 âgés ne présentent ni d'augmentation de la masse graisseuse ni de sur-expression de la myostatine.

Au cours de cette étude, nous avons rencontré d'importantes difficultés dans le maintien des lignées dues à des problèmes de reproduction des animaux. Des coupes des organes reproducteurs sont en cours pour étudier entre autre l'ovogénèse. Ces analyses sont d'autant plus importantes qu'une étude suggère que la protéine GASP-2 est impliquée dans le système reproducteur chez le singe (Harris *et al*., 2014). Les singes NWM (new world monkey) à l'exception de l'espèce *callimico* sont caractérisés par un grand nombre de grossesses gémellaires. Cette étude a identifié quatre gènes (*GDF9, BMP15, BMP4 et GASP-2*) portant des substitutions non synonymes chez les singes NWM (à l'exception de l'espèce *callimico*) entraînant des protéines non fonctionnelles et qui seraient associées aux grossesses gémellaires (***figure 38***).

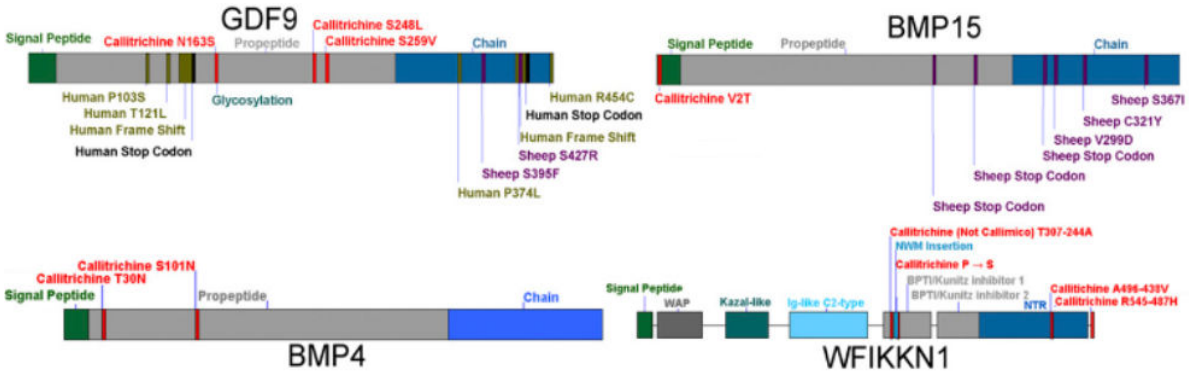


Figure 38 : Position des mutations non synonymes trouvées chez les singes NWM

Les substitutions non synonymes spécifiques des singes NWM (à l'exception de l'espèce *callimico*) (annotées en rouge) jouent probablement un rôle dans la régulation du nombre d'ovules. Des polymorphismes trouvés dans des populations humaines et ovines (annotés en noir et vert, respectivement) montrant une propension aux grossesses gémellaires sont également montrés.

2. Analyses « -omiques » dans un contexte de sur-expression de *Gasp-1*

Les premières études transcriptomiques que nous avons entreprises montrent que la sur-expression de *Gasp-1* affecte différents processus biologiques impliquant ou non le développement musculaire, comme l'adhésion et le cycle cellulaire ou l'angiogénèse. Au début de la différenciation des myoblastes, ces derniers quittent le cycle cellulaire, ne prolifèrent plus et commencent à sécréter la fibronectine dans la matrice extra-cellulaire, se liant à elle via le plus important de ses récepteurs, l'α5β1 intégrine. Le signal fourni par cette adhésion joue un rôle crucial en promouvant la différenciation des myoblastes en cellules musculaires. En effet, quand les myoblastes adhèrent à la fibronectine, ils s'alignent pour former une chaîne. En conséquence, si le processus de l'adhésion cellulaire est altéré par la sur-expression de GASP-1 (dans le sens d'une plus grande adhésion) alors la différenciation des myoblastes augmentera. De même, les processus « cycle cellulaire », « développement musculaire » et « réponses aux blessures » sont altérés par la sur-expression de GASP-1, ce qui est cohérent avec les différentes étapes de la différenciation et de la régénération musculaire. En effet, au début de la différenciation des myoblastes, ces derniers quittent le cycle cellulaire et arrêtent de proliférer. Vers la fin de la différenciation, les myoblastes quittent définitivement le cycle cellulaire et cet arrêt s'accompagne de la synthèse des protéines de contraction. L'hypertrophie des fibres musculaires observée chez les TgGasp-1 peut être la conséquence de la modulation globale des gènes affectés.

L'altération de l'angiogenèse par la sur-expression de GASP-1 est assez intéressante, car l'angiogenèse n'a jamais été associée à GASP-1. L'angiogenèse correspond à la formation de capillaires à partir de vaisseaux sanguins existant et il a été prouvé que la follistatine stimule l'angiogenèse (Zhu *et al*., 2011). Il serait intéressant d'étudier l'effet de la sur-expression de GASP-1 sur l'angiogenèse musculaire par une expérience de transfection sur des explants de tissu musculaire (Jang *et al*., 2004).

Afin de confirmer l'analyse bioinformatique de l'étude transcriptomique de la différenciation des myoblastes sur-exprimant ou non GASP-1, onze gènes ont été sélectionnés en fonction de leur ratio d'expression (*Emcn, CD36, Mfap5, Myh4, Myh7, Myh2, Myh1, Fabp4, FABP3, Serpine1 et Mmp2*). Parmi ces onze gènes, dix gènes (*CD36, Mfap5, Myh4, Myh7, Myh2, Myh1, Fabp4, FABP3, Serpine1 et Mmp2*) ont été sélectionnés car ils sont impliqués dans la différenciation musculaire selon la littérature.

Myh4, Myh7, Myh2 et Myh1

Onze isoformes MyHC sont codées par six gènes *MYH* exprimés largement par le corps musculaire et par cinq autres gènes ayant une expression limitée dans des muscles spécialisés. Cinq isoformes MLC essentielles sont codées par quatre gènes *MYL* et deux isoformes MLC régulateurs sont codées par deux autres gènes *MYL*. Les gènes *Myh7, Myh2, Myh1 et Myh4* sont sous-exprimés par la sur-expression de GASP-1. Ces myosines comme indiqué dans le ***tableau 20*** sont des myosines présentes aux stades embryonnaire ou post-natal précoce. Nos résultats indiqueraient que la sur-expression de GASP-1 fait rentrer les myoblastes plus rapidement en différenctiation éteignant ainsi l'expression des myosines dites « précoces ».

Chaînes lourdes de la myosine	**Gène**	**Expression dans le muscle en développement**	**Expression dans le muscle adulte**
MyHC-slow	*MYH7*	Muscles embryonnaires et foetaux	Fibres musculaires du type 1
MyHC-2A	*MYH2*	Muscles postnataux précoces (murin)	Fibres musculaires du type 2A
MyHC-2X	*MYH1*	Muscles postnataux précoces (murin)	Fibres musculaires du type 2X
MyHC-2B	*MYH4*	Muscles postnataux	Fibres musculaires du type 2B

Tableau 20 : Expression et localisation de plusieurs isoformes de la myosine.
D'après (Schiaffino et al., 2015).

Fabp3, Fabp4

Les Fatty acid binding protein (FABP) sont des protéines intracellulaires de liaison aux lipides qui contrôle le métabolisme et le transport des acides gras à longue chaîne. Fabp3 joue des rôles variés dans le transport des acides gras, la croissance cellulaire et la transcription des gènes. Fabp4 a été relié au développement du syndrome métabolique, du diabète et de l'artériosclérose (Tang *et al*., 2016). Ceci est intéressant, car les souris TgGasp-1 âgées de plus de 15 mois développent un syndrome métabolique (Périè *et al.*, en révision). Ces souris présentent en effet une augmentation des taux de glucose sérique, une accumulation de lipides intramusculaires importante, une stéatose du foie ainsi qu'une augmentation de la masse du tissu adipeux. Ce phénotype est clairement différent de celui des souris knock-out pour la myostatine qui présentent une diminution significative de leur masse graisseuse et un taux de glucose sérique équivalent à celui des souris sauvages (McPherron et Lee, 1997). De plus, des

variations dans la séquence du gène *FABP4* ont été associées au dépôt de graisse intramusculaire chez le bovin (Barendse *et al*., 2009). Ceci est intéressant, car les souris TgGasp-1 ont été associées à une augmentation du tissu adipeux.

Mmp2

Les métallo-protéases matricielles (mmp) sont des protéases qui jouent plusieurs rôles dans la modification de la matrice extracellulaire. Dans l'ensemble les métallo-protéases peuvent dégrader tous les composants de la matrice extracellulaire et doivent donc être régulées finement. Elles sont en général peu exprimées dans les tissus sains, mais leur expression augmente lors des processus de remodelage tissulaire physiologique ou pathologique sous l'effet de facteurs capables de moduler l'expression de leur gène. Dans ces conditions, elles participent à divers phénomènes comme l'angiogenèse, la réparation tissulaire, la régénération musculaire, l'embryogenèse ou encore la cicatrisation cutanée. *Mmp2* joue ainsi un rôle dans la prolifération des cellules satellites, c'est à dire que l'inhibition de *Mmp2* inhibe la prolifération des cellules satellites (Kamanga-Sollo *et al*., 2014). Ce rôle de *Mmp2* est cohérent avec le fait que la sur-expression de GASP-1 entraîne la sur-expression de *Mmp2*.

Serpine1

Le système plasminogène joue un rôle crucial dans la réparation de nombreux tissus, comme les muscles squelettiques. Cette cascade inclut la protéine uPA et son inhibiteur principal Serpine1/PAI1. La fonction classique de uPA est de cliver le plasminogène pour former la plamine active, une protéase qui cible une large variété de molécules de la matrice extra-cellulaire. Les souris déficientes en Serpine1/PAI-1 sont caractérisées par une régénération musculaire accéléré (Koh *et al*., 2005 ; Sisson *et al*., 2009**).** La sur-régulation de Serpine1 et l'augmentation du taux de différenciation et de prolifération des myoblastes sur-exprimant GASP-1 est en contradiction avec le fait que le knock-out de Serpine1 augmente la régénération musculaire (Koh *et al*., 2005). Il est possible que la sur-régulation de Serpine1 par les myoblastes sur-exprimant GASP-1 ne soit pas due directement à la sur-expression de GASP-1, mais plutôt à l'augmentation de la différenciation. Dans cette idée, la sur-régulation de Serpine1 serait due à l'activation d'une voie de signalisation qui se mettrait en place pour compenser l'augmentation de la différenciation des myoblastes surexprimant GASP-1.

Mfap5

Mfap5/MAGP-2 est une glycoprotéine de la matrice extra-cellulaire qui a des fonctions dans la maintenance de l'intégrité des vaisseaux sanguins (Combs *et al*., 2013). Il a été montré que la perte de miR-29 dans les myoblastes entraînent leur trans-différenciation en myofibroblastes via le ciblage de molécules de la matrice extra-cellulaire comme Mfap5 (Wang et al., 2012). De plus, miR-29 est sous le contrôle de la voie des TGFβ.

CD36

CD36 est une protéine multi-fonctionelle qui est impliquée dans le métabolisme, l'immunité, l'angiogenèse et le comportement. De plus, *CD36* est impliquée dans la fusion des myoblastes durant la différenciation myogénique (Park *et al*., 2012). En outre, l'inhibition de *CD36* prévient l'accumulation de lipides dans les cardiomyocytes (Angin *et al*., 2012). Il est à noter que CD36 est sous-régulé par la sur-expression de GASP-1 or la sur-expression de GASP-1 augmente le taux de différenciation et de prolifération des myoblastes (Brun *et al*., 2014). La sous-régulation de *CD36* et l'augmentation du taux de différenciation et de prolifération des myoblastes sur-exprimant GASP-1 est en contradiction avec le fait que le knock down de *CD36* inhibe la différenciation des cellules myoblastiques C2C12 (Park *et al*., 2012). Il est possible que la sous-régulation de *CD36* par les myoblastes sur-exprimant GASP-1 ne soit pas due directement à la sur-expression de GASP-1, mais plutôt à l'augmentation de la différenciation. Dans cette idée, la sous-régulation de *CD36* serait due à l'activation d'une voie de signalisation qui se mettrait en place pour compenser l'augmentation de la différenciation des myoblastes sur-exprimant GASP-1.

Emcn

Aucune étude n'associe Emcn à une fonction musculaire mais ce gène est sur-exprimé environ 50 fois dans les myoblastes en différenciation sur-exprimant GASP-1. L'endomucine est une *O*-sialoglycoprotéine exprimée à la surface de l'endothélium dans les veinules et les capillaires. Cette protéine empêche le contact entre les leucocytes et les molécules d'adhésions dans les tissus sans inflammation. La sous-régulation de l'endomucine est importante pour faciliter l'adhésion des leucocytes dans les tissus avec inflammation (Zahr *et al*., 2016). L'endomucine n'est pas associée à un processus musculaire, selon la littérature, mais l'inflammation des tissus musculaires est un pré-requis à la régénération musculaire

(Schiaffino *et al*., 2016). Il serait intéressant d'étudier l'effet de la sur-expression de GASP-1 dans la régénération musculaire et de vérifier l'implication de l'endomucine dans ce processus.

Afin d'approfondir les connaissances acquises lors de l'étude transcriptomique, une étude protéomique a été réalisée à partir de protéines extraites des quadriceps de souris TgGasp-1 et sauvages. Cela a permis d'identifier des protéines comme PSEM1, ACTA1, CKM ou GRP78/HSPA5 qui semblent intéressantes à étudier.

Conclusion

Il semble établi que la protéine GASP-2 comme la protéine GASP-1 participe à l'homéostasie du muscle squelettique adulte en régulant l'activité de la myostatine. Comme observé lors de la sur-expression de la protéine GASP-1 dans la lignée TgGasp-1, la sur-expression de GASP-2 dans les lignées TgGasp-2 entraîne une hypertrophie des fibres musculaires sans hyperplasie avec cependant, un phénotype d'hypermusculature moins marqué. De plus, la sur-expression de GASP-1 modifie des processus biologiques qui peuvent être importants pour la croissance musculaire telles que l'angiogenèse ou le cycle cellulaire, entre autres.

Ces résultats permettent une meilleure compréhension des rôles de GASP-2 et GASP-1 dans la croissance musculaire, ce qui permettra à terme de mieux contrôler ce processus.

Références

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

Angin, Y., Steinbusch, L.K.M., Simons, P.J., Greulich, S., Hoebers, N.T.H., Douma, K., van Zandvoort, M.A.M.J., Coumans, W.A., Wijnen, W., Diamant, M., et al. (2012). CD36 inhibition prevents lipid accumulation and contractile dysfunction in rat cardiomyocytes. Biochem. J. *448*, 43–53.

Artaza, J.N., Reisz-Porszasz, S., Dow, J.S., Kloner, R.A., Tsao, J., Bhasin, S., and Gonzalez-Cadavid, N.F. (2007). Alterations in myostatin expression are associated with changes in cardiac left ventricular mass but not ejection fraction in the mouse. J. Endocrinol. *194*, 63–76.

Astruc, T., Peyrin, F., Vénien, A., Labas, R., Abrantes, M., Dumas, P., Jamme, F. (2012). In situ thermal denaturation of myofibre sub-type proteins studied by immunohistofluorescence and synchrotron radiation FT-IR microspectroscopy). Food Chem *134*, 1044-1051.

Bányai, L., and Patthy, L. (1999). The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. Protein Sci. Publ. Protein Soc. *8*, 1636–1642.

Bányai, L., Sonderegger, P., and Patthy, L. (2010). Agrin binds BMP2, BMP4 and TGFbeta1. PloS One *5*, e10758.

Barendse, W., Bunch, R.J., Thomas, M.B., and Harrison, B.E. (2009). A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle. Anim. Genet. *40*, 770–773.

Bekhouche, M., Kronenberg, D., Vadon-Le Goff, S., Bijakowski, C., Lim, N.H., Font, B., Kessler, E., Colige, A., Nagase, H., Murphy, G., et al. (2010). Role of the netrin-like domain of procollagen C-proteinase enhancer-1 in the control of metalloproteinase activity. J. Biol. Chem. *285*, 15950–15959.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol. *57*, 289–300.

Bingle, C.D. (2011). Towards defining the complement of mammalian WFDC-domain-containing proteins. Biochem. Soc. Trans. *39*, 1393–1397.

Blanpain, C. (2007). Impact of beta-catenin signaling pathway on stem cell differentiation in the skin. Médecine Sci. MS *23*, 34–36.

Bloemberg, D. and Quadrilatero, J. (2012). Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is dramatically reduced in cardiac, skeletal, and vascular smooth muscle during hypertension. Biochem Biophys Res Commun *391*, 1437-1442.

Bolognesi, M., Gatti, G., Menagatti, E., Guarneri, M., Marquart, M., Papamokos, E., and Huber, R. (1982). Three-dimensional structure of the complex between pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal type) and trypsinogen at 1.8 A resolution. Structure solution, crystallographic refinement and preliminary structural interpretation. J. Mol. Biol. *162*, 839–868.

Bouyer, C., Forestier, L., Renand, G., and Oulmouden, A. (2014). Deep intronic mutation and pseudo exon activation as a novel muscular hypertrophy modifier in cattle. PloS One *9*, e97399.

Brekken, R.A., Sullivan, M.M., Workman, G., Bradshaw, A.D., Carbon, J., Siadak, A., Murri, C., Framson, P.E., Sage, E.H. (2004). Expression and characterization of murine hevin (SC1), a member of the SPARC family of matricellular proteins. J Histochem Cytochem *52*, 735-478.

Brun, C., Monestier, O., Legardinier, S., Maftah, A., and Blanquet, V. (2012). Murine GASP-1 N-glycosylation is not essential for its activity on C2C12 myogenic cells but alters its secretion. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. *30*, 791–804.

Brun, C., Périé, L., Baraige, F., Vernus, B., Bonnieu, A., and Blanquet, V. (2014). Absence of hyperplasia in Gasp-1 overexpressing mice is dependent on myostatin up-regulation. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. *34*, 1241–1259.

Cash, J.N., Rejon, C.A., McPherron, A.C., Bernard, D.J., and Thompson, T.B. (2009). The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. EMBO J. *28*, 2662–2676.

Cash, J.N., Angerman, E.B., Kattamuri, C., Nolan, K., Zhao, H., Sidis, Y., Keutmann, H.T., and Thompson, T.B. (2012). Structure of myostatin·follistatin-like 3: N-terminal domains of follistatin-type molecules exhibit alternate modes of binding. J. Biol. Chem. *287*, 1043–1053.

Chen, J.L., Walton, K.L., Al-Musawi, S.L., Kelly, E.K., Qian, H., La M., Lu, L., Lovrecz, G., Ziemann, M., Lazarus, R., El-Osta, A., Gregorevic, P., Harrison, C.A.(2015). Development of novel activin-targeted therapeutics. Mol Ther. *23*, 434-444.

Chen, J.L., Colgan, T.D., Walton, K.L., Gregorevic, P., Harrison, C.A. (2016). The TGF-β Signalling Network in Muscle Development, Adaptation and Disease. Adv Exp Med Biol *900*, 97-131.

Chowdhury, U.R., Madden, B.J., Charlesworth, M.C., and Fautsch, M.P. (2010). Proteome analysis of human aqueous humor. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *51*, 4921–4931.

Clauss, A., Lilja, H., and Lundwall, A. (2002). A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. Biochem. J. *368*, 233–242.

Clauss, A., Lilja, H., and Lundwall, A. (2005). The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. *333*, 383–389.

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

Combs, M.D., Knutsen, R.H., Broekelmann, T.J., Toennies, H.M., Brett, T.J., Miller, C.A., Kober, D.L., Craft, C.S., Atkinson, J.J., Shipley, J.M., et al. (2013). Microfibril-associated glycoprotein 2 (MAGP2) loss of function has pleiotropic effects in vivo. J. Biol. Chem. *288*, 28869–28880.

da Rocha, A.L., Pereira, B.C., Pauli, J.R., de Souza, C.T., Teixeira, G.R., Lira, F.S., Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Júnior, C.R.B., and da Silva, A.S.R. (2016). Downhill Running Excessive Training Inhibits Hypertrophy in Mice Skeletal Muscles with Different Fiber Type Composition. J. Cell. Physiol. 231, 1045–1056.

del Castillo, I., Cohen-Salmon, M., Blanchard, S., Lutfalla, G., and Petit, C. (1992). Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. Nat. Genet. *2*, 305–310.

DePaolo, L.V. (1997). Inhibins, activins, and follistatins: the saga continues. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N *214*, 328–339.

Drenth, J., Low, B.W., Richardson, J.S., and Wright, C.S. (1980). The toxin-agglutinin fold. A new group of small protein structures organized around a four-disulfide core. J. Biol. Chem. *255*, 2652–2655.

Elkasrawy, M.N., and Hamrick, M.W. (2010). Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. J. Musculoskelet. Neuronal Interact. *10*, 56–63.

Esquela, A.F., and Lee, S.-J. (2003). Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. Dev. Biol. *257*, 356–370.

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

Funkenstein, B., and Rebhan, Y. (2007). Expression, purification, renaturation and activation of fish myostatin expressed in Escherichia coli: facilitation of refolding and activity inhibition by myostatin prodomain. Protein Expr. Purif. *54*, 54–65.

Galko, M.J., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. Science *289*, 1365–1367.

Gray, A.M., and Mason, A.J. (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. Science *247*, 1328–1330.

Grobet, L., Pirottin, D., Farnir, F., Poncelet, D., Royo, L.J., 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.

Grütter, M.G., Fendrich, G., Huber, R., and Bode, W. (1988). The 2.5 A X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. EMBO J. *7*, 345–351.

Haidet, A.M., Rizo, L., Handy, C., Umapathi, P., Eagle, A., Shilling, C., Boue, D., Martin, P.T., Sahenk, Z., Mendell, J.R., et al. (2008). Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 4318–4322.

Harmon, E.B., Apelqvist, A.A., Smart, N.G., Gu, X., Osborne, D.H., and Kim, S.K. (2004). GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes beta-cell differentiation in pancreas development. Dev. Camb. Engl. *131*, 6163–6174.

Harris, R.A., Tardif, S.D., Vinar, T., Wildman, D.E., Rutherford, J.N., Rogers, J., Worley, K.C., and Aagaard, K.M. (2014). Evolutionary genetics and implications of small size and twinning in callitrichine primates. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, 1467–1472.

Hennighausen, L.G., and Sippel, A.E. (1982). Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of “four-disulfide core” proteins. Nucleic Acids Res. *10*, 2677–2684.

Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., and Qiu, Y. (2002). The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. J. Biol. Chem. *277*, 40735–40741.

Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M., and Wolfman, N.M. (2003). Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *17*, 1144–1154.

Hua, L., Liu, Y., Zhen, S., Wan, D., Cao, J., and Gao, X. (2014). Expression and biochemical characterization of recombinant human epididymis protein 4. Protein Expr. Purif. *102*, 52–62.

Huntington, J.A., Read, R.J., and Carrell, R.W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. Nature *407*, 923–926.

Ishii, N., Wadsworth, W.G., Stern, B.D., Culotti, J.G., and Hedgecock, E.M. (1992). UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in C. elegans. Neuron *9*, 873–881.

Jang, H.-S., Kim, H.-J., Kim, J.-M., Lee, Y.-S., Kim, K.L., Kim, J.-A., Lee, J.-Y., Suh, W., Choi, J.-H., Jeon, E.-S., et al. (2004). A novel ex vivo angiogenesis assay based on electroporation-mediated delivery of naked plasmid DNA to skeletal muscle. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *9*, 464–474.

Janssen, S.F., Gorgels, T.G.M.F., Bossers, K., Ten Brink, J.B., Essing, A.H.W., Nagtegaal, M., van der Spek, P.J., Jansonius, N.M., and Bergen, A.A.B. (2012). Gene expression and functional annotation of the human ciliary body epithelia. PloS One *7*, e44973.

Kamanga-Sollo, E., Thornton, K.J., White, M.E., and Dayton, W.R. (2014). Role of G protein-coupled estrogen receptor-1, matrix metalloproteinases 2 and 9, and heparin binding epidermal growth factor-like growth factor in estradiol-17β-stimulated bovine satellite cell proliferation. Domest. Anim. Endocrinol. *49*, 20–26.

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

Katsimpardi, L., Litterman, N.K., Schein, P.A., Miller, C.M., Loffredo, F.S., Wojtkiewicz, G.R., Chen, J.W., Lee, R.T., Wagers, A.J., and Rubin, L.L. (2014). Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. Science *344*, 630–634.

Kellum, E., Starr, H., Arounleut, P., Immel, D., Fulzele, S., Wenger, K., and Hamrick, M.W. (2009). Myostatin (GDF-8) deficiency increases fracture callus size, Sox-5 expression, and callus bone volume. Bone *44*, 17–23.

Keutmann, H.T., Schneyer, A.L., and Sidis, Y. (2004). The role of follistatin domains in follistatin biological action. Mol. Endocrinol. Baltim. Md *18*, 228–240.

Khalil, A.M., Dotimas, H., Kahn, J., Lamerdin, J.E., Hayes, D.B., Gupta, P., and Franti, M. (2016). Differential Binding Activity of TGF-β Family Proteins to Select TGF-β Receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. *358*, 423–430.

Kim, J., Wu, H.-H., Lander, A.D., Lyons, K.M., Matzuk, M.M., and Calof, A.L. (2005). GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. Science *308*, 1927–1930.

Koh, T.J., Bryer, S.C., Pucci, A.M., and Sisson, T.H. (2005). Mice deficient in plasminogen activator inhibitor-1 have improved skeletal muscle regeneration. Am. J. Physiol. Cell Physiol. *289*, C217-223.

Kondás, K., Szláma, G., Trexler, M., and Patthy, L. (2008). Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for growth and differentiation factors 8 and 11. J. Biol. Chem. *283*, 23677–23684.

Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., and Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *60*, 2427–2444.

Kunitz, M., and Northrop, J.H. (1936). Isolation from beff pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trysin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. J. Gen. Physiol. *19*, 991–1007.

Larsen, M., Ressler, S.J., Lu, B., Gerdes, M.J., McBride, L., Dang, T.D., and Rowley, D.R. (1998). Molecular cloning and expression of ps20 growth inhibitor. A novel WAP-type “four-disulfide core” domain protein expressed in smooth muscle. J. Biol. Chem. *273*, 4574–4584.

Laskowski, M., and Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. Annu. Rev. Biochem. *49*, 593–626.

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

Lee, Y.-S., and Lee, S.-J. (2013). Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, E3713-3722.

Lee, Y.-S., and Lee, S.-J. (2015). Roles of GASP-1 and GDF-11 in Dental and Craniofacial Development. J. Oral Med. Pain *40*, 110–114.

Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., and De Robertis, E.M. (1997). Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. Cell *88*, 747–756.

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

Liepinsh, E., Banyai, L., Pintacuda, G., Trexler, M., Patthy, L., and Otting, G. (2003). NMR structure of the netrin-like domain (NTR) of human type I procollagen C-proteinase enhancer defines structural consensus of NTR domains and assesses potential proteinase inhibitory activity and ligand binding. J. Biol. Chem. *278*, 25982–25989.

Liepinsh, E., Nagy, A., Trexler, M., Patthy, L., and Otting, G. (2006). Second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN1 protein. J. Biomol. NMR *35*, 73–78.

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

Liu, J.-P. (2006). The function of growth/differentiation factor 11 (Gdf11) in rostrocaudal patterning of the developing spinal cord. Dev. Camb. Engl.

133, 2865–2874.

Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Jay, S.M., Gannon, J., Pancoast, J.R., Yalamanchi, P., Sinha, M., Dall'Osso, C., Khong, D., Shadrach, J.L., et al. (2013). Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. Cell *153*, 828–839.

Manickam, R., Pena, R.N., and Whitelaw, C.B.A. (2008). Mammary gland differentiation inversely correlates with GDF-8 expression. Mol. Reprod. Dev. *75*, 1783–1788.

Matsakas, A., Macharia, R., Otto, A., Elashry, M.I., Mouisel, E., Romanello, V., Sartori, R., Amthor, H., Sandri, M., Narkar, V., et al. (2012). Exercise training attenuates the hypermuscular phenotype and restores skeletal muscle function in the myostatin null mouse. Exp. Physiol. 97, 125–140.

Matzuk, M.M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D.R., and Bradley, A. (1995). Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. Nature *374*, 360–363.

McPherron, A.C., and Lee, S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 12457–12461.

McPherron, A.C., and Lee, S.-J. (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. J. Clin. Invest. *109*, 595–601.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature *387*, 83–90.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1999). Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. Nat. Genet. *22*, 260–264.

McPherron, A.C., Huynh, T.V., and Lee, S.-J. (2009). Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function. BMC Dev. Biol. *9*, 24.

Medeiros, E.F., Phelps, M.P., Fuentes, F.D., and Bradley, T.M. (2009). Overexpression of follistatin in trout stimulates increased muscling. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *297*, R235-242.

Michel, U., Farnworth, P., and Findlay, J.K. (1993). Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. Mol. Cell. Endocrinol. *91*, 1–11.

Monestier, O., Brun, C., Heu, K., Passet, B., Malhouroux, M., Magnol, L., Vilotte, J.-L., and Blanquet, V. (2012a). Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype. BMC Genomics *13*, 541.

Monestier, O., Brun, C., Cocquempot, O., Petit, D., and Blanquet, V. (2012b). GASP/WFIKKN proteins: evolutionary aspects of their functions. PloS One *7*, e43710.

Morello, D. (1999). Les souris transgéniques : 1. un passé bien rempli, un avenir très prometteur. Hépato-Gastro Oncol. Dig. *6*, 221–226.

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

Mott, J.D., Thomas, C.L., Rosenbach, M.T., Takahara, K., Greenspan, D.S., and Banda, M.J. (2000). Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. J. Biol. Chem. *275*, 1384–1390.

Nagy, A., Trexler, M., and Patthy, L. (2003). Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein. Eur. J. Biochem. FEBS *270*, 2101–2107.

Nakashima, M., Toyono, T., Akamine, A., and Joyner, A. (1999). Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. Mech. Dev. *80*, 185–189.

Nazari, M., Salabi, F., Zhang, L., Zhao, F., Wei, C., and Du, L. (2014). AAV2-mediated follistatin overexpression induces ovine primary myoblasts proliferation. BMC Biotechnol. *14*, 87.

Nishida, A.T., Kobuke, K., Kojima, K., Ito, J., Honjo, T., and Tashiro, K. (2004). OC29 is preferentially expressed in the presumptive sensory organ region of the otocyst. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. *231*, 766–774.

Park, S.-Y., Yun, Y., and Kim, I.-S. (2012). CD36 is required for myoblast fusion during myogenic differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *427*, 705–710.

Pèrié, L., Parenté, A., Brun, C., Magnol, L., Pélissier, P., and Blanquet, V. (2016). Enhancement of C2C12 myoblast proliferation and differentiation by GASP-2, a myostatin inhibitor. Biochem. Biophys. Rep. *6*, 39–46.

Ranganathan, S., Simpson, K.J., Shaw, D.C., and Nicholas, K.R. (1999). The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. J. Mol. Graph. Model. *17*, 106–113, 134–136.

Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Bateman, A. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Research *40*, 343-350.

Richardson, R.T., Sivashanmugam, P., Hall, S.H., Hamil, K.G., Moore, P.A., Ruben, S.M., French, F.S., and O'Rand, M. (2001). Cloning and sequencing of human Eppin: a novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. Gene *270*, 93–102.

Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., and Huber, R. (1973). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. J. Mol. Biol. *77*, 417–436.

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

Schiaffino, S., Rossi, A.C., Smerdu, V., Leinwand, L.A., and Reggiani, C. (2015). Developmental myosins: expression patterns and functional significance. Skelet. Muscle *5*, 22.

Schiaffino, S., Pereira, M.G., Ciciliot, S., and Rovere-Querini, P. (2016). Regulatory T cells and skeletal muscle regeneration. FEBS J.

Scott, A., Weldon, S., and Taggart, C.C. (2011). SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. Biochem. Soc. Trans. *39*, 1437–1440.

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

Shigetomi, H., Onogi, A., Kajiwara, H., Yoshida, S., Furukawa, N., Haruta, S., Tanase, Y., Kanayama, S., Noguchi, T., Yamada, Y., et al. (2010). Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *59*, 679–687.

Sinha, M., Jang, Y.C., Oh, J., Khong, D., Wu, E.Y., Manohar, R., Miller, C., Regalado, S.G., Loffredo, F.S., Pancoast, J.R., et al. (2014). Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. Science *344*, 649–652.

Sisson, T.H., Nguyen, M.-H., Yu, B., Novak, M.L., Simon, R.H., and Koh, T.J. (2009). Urokinase-type plasminogen activator increases hepatocyte growth factor activity required for skeletal muscle regeneration. Blood *114*, 5052–5061.

Szláma, G., Kondás, K., Trexler, M., and Patthy, L. (2010). WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGFβ1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. FEBS J. *277*, 5040–5050.

Szláma, G., Trexler, M., and Patthy, L. (2013). Latent myostatin has significant activity and this activity is controlled more efficiently by WFIKKN1 than by WFIKKN2. FEBS J. *280*, 3822–3839.

Tang, Z., Shen, Q., Xie, H., Zhou, X., Li, J., Feng, J., Liu, H., Wang, W., Zhang, S., and Ni, S. (2016). Elevated expression of FABP3 and FABP4 cooperatively correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). Oncotarget.

Thies, R.S., Chen, T., Davies, M.V., Tomkinson, K.N., Pearson, A.A., Shakey, Q.A., and Wolfman, N.M. (2001). GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. Growth Factors Chur Switz. *18*, 251–259.

Thompson, R.C., and Ohlsson, K. (1986). Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 6692–6696.

Trexler, M., Bányai, L., and Patthy, L. (2001). A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 3705–3709.

Trexler, M., Bányai, L., and Patthy, L. (2002). Distinct expression pattern of two related human proteins containing multiple types of protease-inhibitory modules. Biol. Chem. *383*, 223–228.

Tsunemi, M., Matsuura, Y., Sakakibara, S., and Katsube, Y. (1996). Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 A resolution. Biochemistry (Mosc.) *35*, 11570–11576.

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

Walker, R.G., Angerman, E.B., Kattamuri, C., Lee, Y.-S., Lee, S.-J., and Thompson, T.B. (2015). Alternative binding modes identified for growth and differentiation factor-associated serum protein (GASP) family antagonism of myostatin. J. Biol. Chem. *290*, 7506–7516.

Walker, R.G., Poggioli, T., Katsimpardi, L., Buchanan, S.M., Oh, J., Wattrus, S., Heidecker, B., Fong, Y.W., Rubin, L.L., Ganz, P., et al. (2016). Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: Similarities, Differences, and Questions for Future Investigation. Circ. Res. *118*, 1125–1141; discussion 1142.

Wang, L., Zhou, L., Jiang, P., Lu, L., Chen, X., Lan, H., Guttridge, D.C., Sun, H., and Wang, H. (2012). Loss of miR-29 in myoblasts contributes to dystrophic muscle pathogenesis. Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *20*, 1222–1233.

Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., and Zhang, B. (2013). WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. Nucleic Acids Res. *41*, W77-83.

Welt, C., Sidis, Y., Keutmann, H., and Schneyer, A. (2002). Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. Exp. Biol. Med. Maywood NJ *227*, 724–752.

Wiedow, O., Schröder, J.M., Gregory, H., Young, J.A., and Christophers, E. (1990). Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. J. Biol. Chem. *265*, 14791–14795.

Williams, M.S. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. N. Engl. J. Med. *351*, 1030-1031-1031.

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

Yadin, D., Knaus, P., and Mueller, T.D. (2016). Structural insights into BMP receptors: Specificity, activation and inhibition. Cytokine Growth Factor Rev. *27*, 13–34.

Zahr, A., Alcaide, P., Yang, J., Jones, A., Gregory, M., dela Paz, N.G., Patel-Hett, S., Nevers, T., Koirala, A., Luscinskas, F.W., et al. (2016). Endomucin prevents leukocyte-endothelial cell adhesion and has a critical role under resting and inflammatory conditions. Nat. Commun. *7*, 10363.

Zhang, B., Kirov, S., and Snoddy, J. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. Nucleic Acids Res. *33*, W741-748.

Zhang, C., McFarlane, C., Lokireddy, S., Masuda, S., Ge, X., Gluckman, P.D., Sharma, M., and Kambadur, R. (2012). Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice. Diabetologia *55*, 183–193.

Zhang, X., and Wang, Y. (2016). Glycosylation Quality Control by the Golgi Structure. J. Mol. Biol. *428*, 3183–3193.

Zhu, J., Li, Y., Lu, A., Gharaibeh, B., Ma, J., Kobayashi, T., Quintero, A.J., and Huard, J. (2011). Follistatin improves skeletal muscle healing after injury and disease through an interaction with muscle regeneration, angiogenesis, and fibrosis. Am. J. Pathol. *179*, 915–930.

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

Site WEB

http://atlasgeneticsoncology.org//Genes/FSTID44477ch5q11.html
http://www.webgestalt.org
http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
http://genepattern.broadinstitute.org/
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Annexe 1

Test LDH

Solutions utilisées :

Tampon de réaction (Tp1) : TEA 50mM
EDTA 5 mM
Pyruvate Na 2,07mM

NADH : 7,04 mM

La distribution des échantillons est faite automatiquement selon le tableau 1 décrit ci-dessous :

Etape	Distribution	Incubation	Mesure 340 nm/380nm
1	Tp1, 140 µl		
2	NADH, 10 µl		
3		60 sec	
4			Point final/Blanc
5	Echantillon, 2µl		
6		60 sec	
7			120 sec(7 points)

Tableau 1 : Protocole utilisé pour le dosage de la LDH sur l'analyseur Thermo Scientific Type Konelab 30

Test ICDH

Solutions utilisées :

Tampon de réaction (Tp2) : Na2HPO4 38,9 mM
MgCl2 0,5 mM
Triton 0,05%
NADP 0,36 mM

Isocitrate : 375,4 mM

La distribution des échantillons est faite automatiquement selon le tableau 2 décrit ci-dessous :

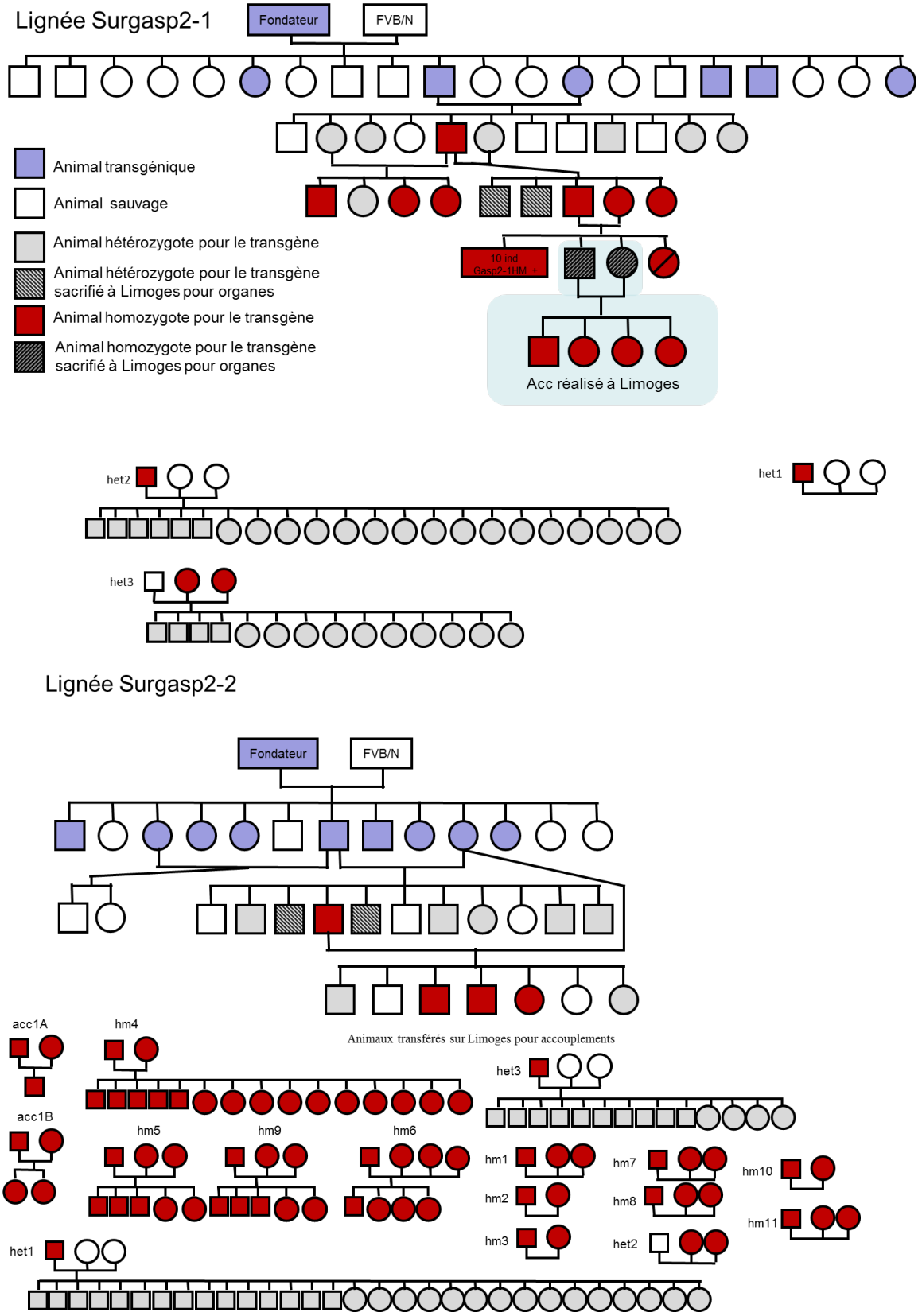
Etape	Distribution	Incubation	Mesure 340 nm/380nm
1	Tp2, 140 µl		
2		60 sec	
3	Isocitrate, 10 µl		
4			Point final/Blanc
5	Echantillon, 2µl		
6		60 sec	
7			120 sec(7 points)

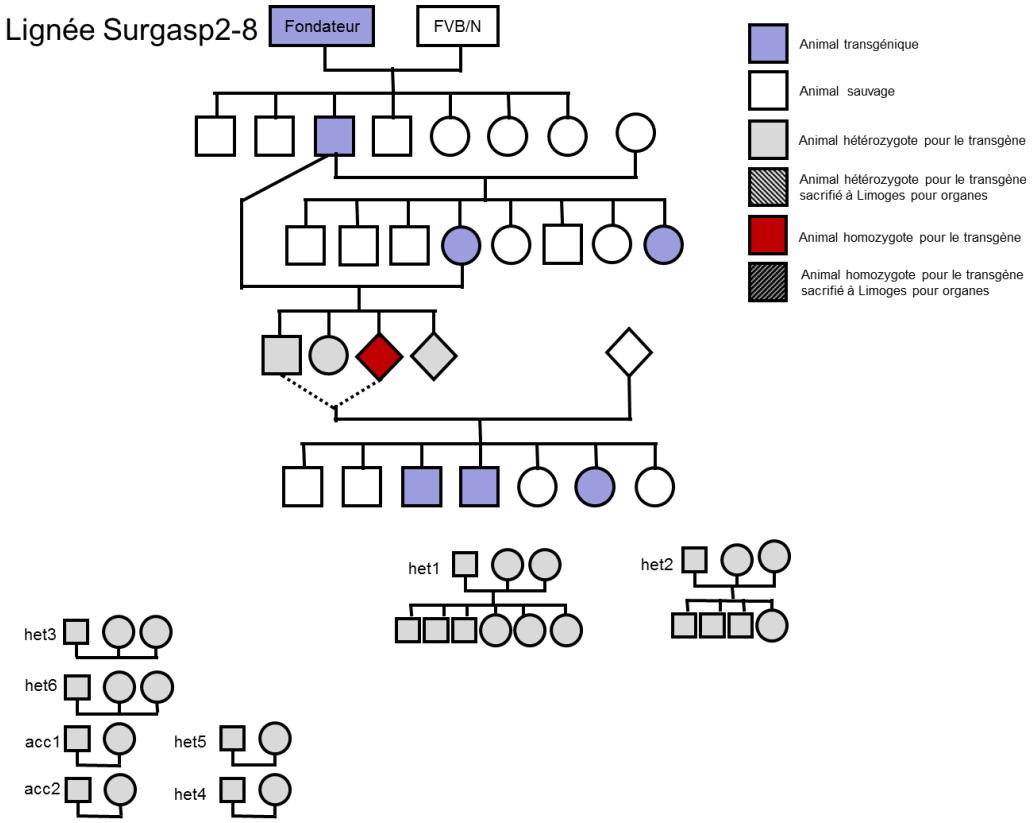
Tableau 2 : Protocole utilisé pour le dosage de l'ICDH sur l'analyseur Thermo Scientific Type Konelab 30

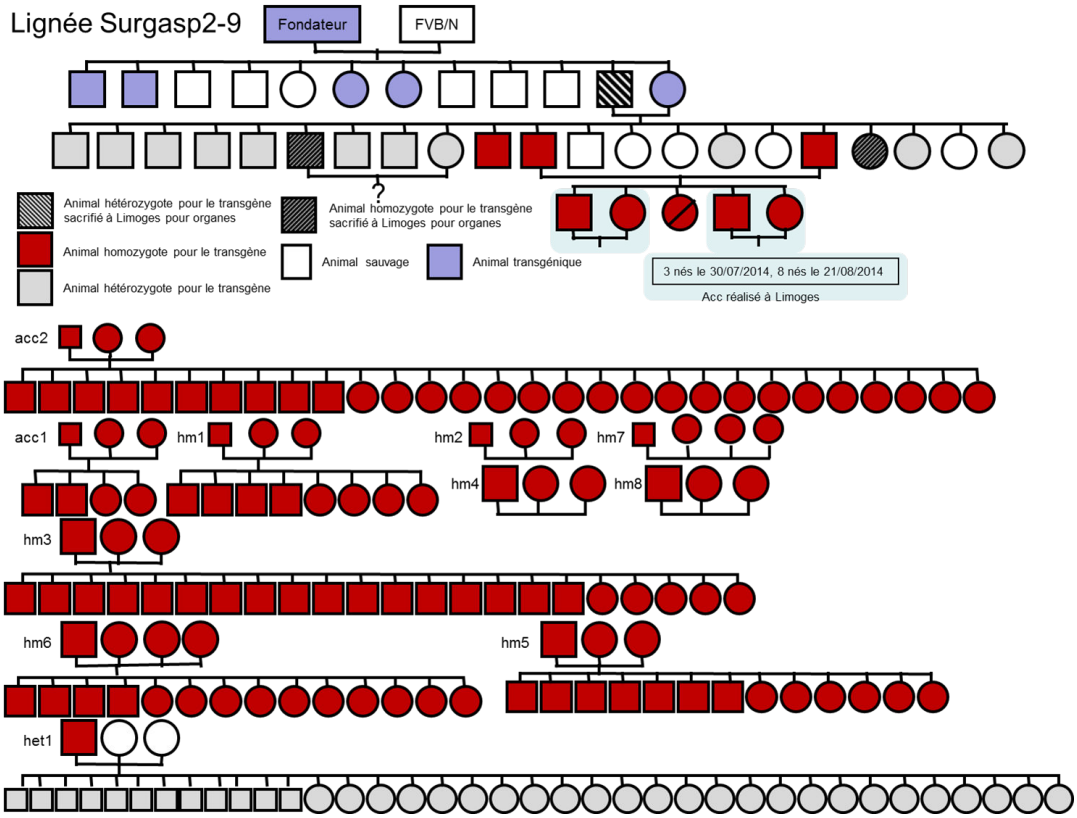
Annexe 2

Généalogies

Les croisements homozygotes sont désignés hm et les croissements hétérozygotes sont désignés het.




Lignée Surgasp2-8
Fondateur
FVB/N
Animal transgénique
Animal sauvage
Animal hétérozygote pour le transgène
Animal hétérozygote pour le transgène sacrifié à Limoges pour organes
Animal homozygote pour le transgène
Animal homozygote pour le transgène sacrifié à Limoges pour organes
het1
het2
het3
het6
acc1
acc2
het5
het4


Lignée Surgasp2-9
Fondateur
FVB/N
?
Animal hétérozygote pour le transgène sacrifié à Limoges pour organes
Animal homozygote pour le transgène sacrifié à Limoges pour organes
Animal homozygote pour le transgène
Animal sauvage
Animal transgénique
Animal hétérozygote pour le transgène
3 nés le 30/07/2014, 8 nés le 21/08/2014
Acc réalisé à Limoges
acc2
acc1
hm1
hm2
hm7
hm4
hm8
hm3
hm6
hm5
het1

Annexe 3

Les différents processus biologiques affectés par la sur-expression de GASP-1

Processus biologiques :

- enrichis avec les gènes variants à 0h de différenciation		C	O	E	R	rawP	adjP
muscle system process	GO:0003012	205	54	12,07	4,47	2,72E-021	1,23E-018
regulation of muscle system process	GO:0090257	116	30	6,83	4,39	3,35E-012	2,94E-010
muscle contraction	GO:0006936	176	44	10,37	4,25	1,17E-016	2,15E-014
angiogenesis	GO:0001525	324	66	19,08	3,46	3,33E-019	7,53E-017
urogenital system development	GO:0001655	229	45	13,49	3,34	6,48E-013	6,56E-011
blood vessel morphogenesis	GO:0048514	406	78	23,91	3,26	7,34E-021	2,88E-018
regulation of cell adhesion	GO:0030155	253	48	14,9	3,22	4,32E-013	4,53E-011
blood vessel development	GO:0001568	469	83	27,62	3,01	8,97E-020	2,51E-017
vasculature development	GO:0001944	484	84	28,5	2,95	1,90E-019	4,65E-017
regulation of anatomical structure morphogenesis	GO:0022603	573	98	33,75	2,9	4,55E-022	2,43E-019
circulatory system development	GO:0072359	701	116	41,28	2,81	9,44E-025	6,93E-022
cardiovascular system development	GO:0072358	701	116	41,28	2,81	9,44E-025	6,93E-022
response to wounding	GO:0009611	578	94	34,04	2,76	1,21E-019	3,09E-017
muscle structure development	GO:0061061	416	67	24,5	2,73	4,29E-014	5,14E-012

- enrichis avec les gènes variants à 12h de différenciation		C	O	E	R	rawP	adjP
angiogenesis	GO:0001525	324	76	25,92	2,93	5,59E-018	2,85E-015
blood vessel morphogenesis	GO:0048514	406	84	32,48	2,59	3,22E-016	9,38E-014
blood vessel development	GO:0001568	469	90	37,52	2,40	3,52E-015	7,18E-013
vasculature development	GO:0001944	484	92	38,72	2,38	3,16E-015	6,78E-013
circulatory system development	GO:0072359	701	118	56,08	2,10	4,16E-015	7,71E-013
cardiovascular system development	GO:0072358	701	118	56,08	2,10	4,16E-015	7,71E-013
cytoskeleton organization	GO:0007010	695	112	55,6	2,01	4,37E-013	5,75E-011
cell adhesion	GO:0007155	774	122	61,92	1,97	1,83E-013	2,67E-011
biological adhesion	GO:0022610	779	122	62,32	1,96	2,91E-013	3,96E-011

- enrichis avec les gènes variants à 24h de différenciation		C	O	E	R	rawP	adjP
DNA-dependent DNA replication	GO:0006261	60	26	4,58	5,67	4,00E-014	5,04E-012
chromosome segregation	GO:0007059	126	43	9,63	4,47	9,75E-018	2,26E-015
M phase of mitotic cell cycle	GO:0000087	303	85	23,15	3,67	5,89E-027	3,87E-024
nuclear division	GO:0000280	298	83	22,77	3,65	4,11E-026	2,03E-023
mitosis	GO:0007067	298	83	22,77	3,65	4,11E-026	2,03E-023
organelle fission	GO:0048285	317	85	24,22	3,51	1,83E-025	8,02E-023
DNA replication	GO:0006260	218	58	16,65	3,48	1,39E-017	3,05E-015
cell division	GO:0051301	418	105	31,93	3,29	1,18E-028	9,31E-026
M phase	GO:0000279	434	108	33,15	3,26	4,46E-029	4,40E-026
cell cycle phase	GO:0022403	590	130	45,07	2,88	3,13E-029	4,12E-026
microtubule cytoskeleton organization	GO:0000226	255	55	19,48	2,82	1,33E-012	1,19E-010
mitotic cell cycle	GO:0000278	520	111	39,72	2,79	7,62E-024	2,51E-021
cell cycle process	GO:0022402	766	158	58,52	2,70	5,92E-032	2,34E-028
angiogenesis	GO:0001525	324	65	24,75	2,63	4,19E-013	4,03E-011
regulation of cell cycle process	GO:0010564	304	60	23,22	2,58	6,93E-012	4,88E-010
blood vessel morphogenesis	GO:0048514	406	78	31,02	2,51	2,11E-014	2,78E-012
blood vessel development	GO:0001568	469	86	35,83	2,40	1,59E-014	2,24E-012
vasculature development	GO:0001944	484	88	36,97	2,38	1,30E-014	1,90E-012
cell cycle	GO:0007049	1087	195	83,04	2,35	7,51E-031	1,48E-027

Annexe 4

Liste des 600 gènes variant et appartenant aux processus biologiques activés. La couleur rouge correspond aux ratios de sur-expression, la couleur bleue correspond aux ratios de sous-expression.

Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
59308	Emcn/endomucin	3	43,86541	50,048503	46,043011
12562	Cdh5/VE-cadherin/cadherin 5/VE-Cad	8	16,47912	14,485979	15,206062
12495	Entpd1	19	9,628907	5,3386038	6,3475045
13024	Ctla2a	13	7,17789	5,9574089	8,9049081
11770	Fabp4/fatty acid binding proteins 4	3	6,888449	8,0447558	12,408258
21838	Thy1	9	6,403691	7,3076533	9,8248983
18787	Serpine1/Plasminogen activator inhibitor-1/PAI-1	5	6,300222	5,0271108	3,5072531
16948	Lox	18	6,181032	4,171498	3,8574432
50530	Mfap5/MAGP-2	6	5,742641	4,7614683	5,2705914
20344	Selp/P-selectin	1	5,678556	4,0422349	5,300275
278507	WFIKKN2	11	5,652504	4,7403498	4,3765915
21789	Tfpi2	6	5,520877	2,9129167	3,3879443
29817	Igfbp7	5	4,958319	2,9489216	4,1158124
13614	Edn1/ET-1/endothelin-1	13	4,825717	3,7886072	4,5936685
19124	Procr	2	4,776782	4,2290914	4,0685843
19263	Ptprb	10	4,740273	4,080649	6,3007592
19223	Ptgis	2	4,426808	2,0659141	2,0908887
14219	Ctgf/CCN2	10	4,253387	3,8437348	3,5162198
259277	Klk8	8	4,251193	2,6334587	2,8508394
68178	Cgnl1	9	4,192187	3,725984	2,9445783
238276	AKAP5/AKAP150/AKAP79	12	4,073645	4,2740157	4,1199536
94242	Tinagl1/Adrenocortical zonation factor 1/Lipocalin-7	4	3,803211	3,4770553	3,0390699
13609	S1pr1/S1p/sphingosine-1-phosphate	3	3,793147	2,7923627	2,0554666
20257	Stmn2/stathmin-like 2	3	3,736153	3,3587478	4,7335877
18788	Serpinb2/PAI-2/Plasminogen activator inhibitor-2	1	3,692502	1,7296356	1,8465856
18613	Pecam1/cd31	9	3,633813	6,7132148	5,1539774
68545	Ecscr	18	3,465262	3,2098555	4,372711
14115	Fbln2/fibulin 2	6	3,404299	3,1545238	2,6156088
13601	Ecm1	3	3,352534	2,5676394	3,4871386
17395	Mmp9	2	3,240836	2,0802786	1,1479175
20287	Sct/secretin	7	3,159986	2,127311	4,5752192
12490	Cd34	1	3,112106	3,1385365	2,5766013
21380	Tbx1	16	3,106427	3,1386505	2,4569933
16398	Itga2	13	2,987768	2,2490601	1,5230974
18595	Pdgfra	5	2,921233	2,0088898	1,3763842
64074	Smoc2	17	2,920427	1,7367164	1,5544699
12389	Cav1	6	2,839428	2,9814558	3,9069189
16323	INHBA	13	2,74793	2,3652842	2,0027982
17390	Mmp2	8	2,730599	2,6213798	3,1626404
20377	Sfrp1	8	2,693939	3,2937207	4,4996406
20296	Ccl2	11	2,636143	1,7527514	2,3986382
11535	Adm/adrenomedullin	7	2,614162	3,3714466	3,4705103
14173	Fgf2	3	2,597256	2,4094673	3,1602459
18654	Pgf/Placental growth factor	12	2,455612	1,7441216	1,6549214
21788	Tfpi	2	2,449267	2,2317386	2,7410041
18812	Prl2c3	13	2,424625	1,9241734	2,5933552
21824	Thbd/thrombomodulin	2	2,41932	1,8301084	1,927854
11568	Aebp1/ACLP/aortic carboxypeptidase-like protein	11	2,384765	2,6815827	2,0205703
13805	Eng/endoglin	2	2,381717	2,4944235	3,140038
16859	Lgals9/galectin-9	11	2,353882	2,9105089	2,7518977
18073	Nid1/nidogen-1/entactin-1	13	2,289722	2,6916043	2,2497623
13874	Ereg/epiregulin	5	2,267383	1,0731426	2,1809796

80837	Rhoj/TC10L	12	2,230771	2,5826037	2,6836981
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
13057	Cyba/p22phox	8	2,224801	2,0281888	1,7088292
216616	Efemp1	11	2,201039	1,5797713	2,3027358
65255	Asb4	6	2,197769	2,0193072	1,2914741
18791	Plat/tissue plasminogen activator/tPA	8	2,188907	2,440138	1,8739951
22341	Vegfc	8	2,118704	1,1082393	1,7772832
18163	Ctnnd2	15	2,117655	1,964373	1,8009776
13649	Egfr/epidermal growth factor receptor	11	2,103779	1,3460518	1,3714336
21345	Tagln/sm22a/SM22alpha	9	2,031284	1,6070827	1,4103663
16403	Itga6	2	2,024392	2,6477868	1,4967901
107849	Prl2c5	13	2,004644	1,9672177	2,1725426
50766	Crim1	17	1,982263	2,1681823	1,6058203
16449	Jag1	2	1,973304	1,9232673	1,2699313
12159	Bmp4	14	1,947322	2,7294369	4,3688816
16000	Igf1	10	1,945118	2,3040996	2,4135772
18187	Nrp2/Neuropilin-2	1	1,93081	1,6408462	1,7074269
22240	Dpysl3/Ulip/CRMP-4	18	1,926367	1,9716662	1,5552726
14257	Flt4	11	1,923854	1,6077893	1,2847282
104027	Synpo/synaptopodin	18	1,905353	1,8492216	1,7509721
11489	Adam12	7	1,878829	1,4813179	1,1388027
64058	Perp	10	1,875938	2,1411587	2,7263979
14178	Fgf7	2	1,873357	1,5093803	1,6706234
12161	Bmp6	13	1,862414	2,1432437	2,364012
17760	Mtap6/STOP	7	1,852128	1,4507168	2,0291191
15368	Hmox1/heme oxygenase-1	8	1,850765	1,4874586	1,6551789
12628	Cfh	1	1,850627	1,9339666	1,9101437
14600	Ghr	15	1,837752	1,5027281	1,7377
19039	Lgals3bp	11	1,834469	1,8300225	1,6314903
16456	F11r/F11 receptor	1	1,803093	1,9807303	1,3792295
330267	Thsd7a	6	1,800545	1,9350873	1,8904349
15937	Ier3/IEX-1/gly96	17	1,794524	1,2703114	1,9178886
17064	Cd93	2	1,793072	1,3123052	1,1733862
22223	Uchl1	5	1,760138	1,3736928	2,1679179
12804	Cntfr/ciliary neurotrophic factor receptor	4	1,74533	1,2925789	1,5390665
12826	Col4a1	8	1,732269	1,7192708	1,3369651
16416	Itgb3/integrin-β3/Beta3-integrin	11	1,72637	1,1668394	1,3318227
19224	Ptgs1/cyclooxygenase-1/COX-1	2	1,720839	1,063905	1,0445965
17130	Smad6	9	1,714891	1,3163378	1,9092911
20312	Cx3cl1/Fractalkine	8	1,713269	0,9659889	0,8735481
11601	Angpt2/angiopoietin 2	8	1,69806	1,1350652	1,6178728
14066	F3/Tissue factor/Tf	3	1,681729	1,5040166	1,329072
76969	Chst1	2	1,678156	1,3504705	1,7281718
11502	Adam9	8	1,666902	1,6473039	1,3932297
12552	Cdh11/cadherin 11	8	1,660295	1,6067307	2,44243
140580	Elmo1	13	1,659839	1,7083623	2,0438968
223881	Rnd1	15	1,656617	1,8897529	1,4071634
259300	Ehd2	7	1,649588	1,385485	1,8409474
14239	Foxs1	2	1,647094	1,3159727	1,2989159
14419	Gal/galanin	19	1,646053	0,6288644	0,6578088
17304	Mfge8/MFG-E8	7	1,643189	1,9446838	1,099174
74376	Myo18b	5	1,638226	2,8244683	4,039666
16790	Anpep/Cd13/APN	7	1,637982	1,212397	1,1792983
20613	Snai1/Snail	2	1,611582	1,7350397	1,2541674
14457	Gas7	11	1,609354	1,6781932	1,2400105
54608	Abhd2/alpha/beta hydrolase domain containing 2	7	1,598823	1,2025071	0,7467354
12876	Cpe/carboxypeptidase E	8	1,595222	1,5305342	2,1438569
383619	Aim2	1	1,594733	1,5095476	1,575309
17131	Smad7	18	1,592561	1,2423849	1,2687388
23972	Papss2	19	1,578296	1,617476	1,5949107

227753	Gsn/gelsolin	2	1,57361	1,860323	1,6002539
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
19225	Ptgs2/COX2/Cyclooxygenase-2	1	1,570442	1,516279	1,5812922
18049	NGF/nerve growth factor	3	1,569381	0,9231204	1,6363437
448987	FBXL7	15	1,566743	1,3300779	1,6359976
14165	Fgf10	13	1,559372	1,3354572	1,7654923
18484	Pam/peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	1	1,559128	2,1119809	1,1334436
11745	Anxa3	5	1,559016	2,0049092	1,4455656
16193	Il6	5	1,555379	2,09062	2,2388547
12818	Col14a1/collagen type XIV	15	1,550504	1,3971161	1,9074282
22418	Wnt5a	14	1,548871	1,4964922	1,4264397
74202	Fblim1/migfilin	4	1,548792	1,3369888	1,082208
12527	Cd9/Tetraspanin CD9	6	1,53585	1,3730719	1,4416517
20606	Sstr2/sst2A	11	1,527044	1,2223991	0,9552521
84004	Mcam/CD146	9	1,524664	1,4884889	2,1074327
106952	ARAP3	18	1,522267	1,1849896	1,1966429
54598	Calcrl/Calcitonin receptor-like receptor	2	1,519296	1,6920301	1,6938857
19664	Rbpj/RBP-Jκ/RBP-J/Rbpsuh	5	1,51906	1,4375636	1,0450723
18984	POR	5	1,517516	1,0817317	1,3271307
14465	Gata6	18	1,517002	1,3216364	2,4243188
15901	Id1	2	1,515483	1,0929643	1,226103
14260	Fmn1	2	1,514831	1,4136341	1,349498
13841	Epha7	4	1,507776	1,3695536	1,1795354
13132	Dab2/Disabled-2	15	1,506663	1,3422474	1,9227971
21817	Tgm2/Transglutaminase 2/Tissue transglutaminase 2/TG2/Transglutaminase C	2	1,506094	1,9080139	1,4816625
19699	RELN	5	1,495602	0,9613777	0,6596338
16848	LFNG	5	1,495273	1,5442183	2,239497
109620	Dsp/desmoplakin	13	1,48997	1,4369955	1,3801567
27205	Podxl	6	1,489334	0,7544319	0,8957034
15200	Hbegf/heparin-binding EGF-like growth factor	18	1,485661	1,0375731	0,9391163
286940	Flnb/filamin B	14	1,484536	1,3188111	1,3106191
21667	Tdgf1/Cripto/Cripto-1	9	1,483481	0,8892357	1,098542
21923	Tnc/Tenascin-C	4	1,481721	1,1200353	1,0592838
56348	Hsd17b12	2	1,479989	1,2319893	0,9471299
232174	Cyp26b1	6	1,478492	1,5528844	1,4054096
17289	Mertk	2	1,477364	1,1537857	1,8144056
15903	Id3	4	1,47308	1,2882048	1,2312665
76527	Il34	8	1,472434	0,9644187	0,7753448
12837	Col8a1	16	1,471674	1,0269716	2,2440357
23959	Nt5e	9	1,467511	1,9605951	1,9105645
14825	Cxcl1	5	1,461707	1,0178478	1,5969208
16007	Cyr61	3	1,461314	1,5727095	1,0500398
20306	Ccl7/MCP-3	11	1,457545	1,6128976	1,9833675
12443	CCND1/cyclin D1	7	1,457435	1,0706567	1,3554272
16190	Il4ra	7	1,456998	1,5261937	1,2396425
26949	VAT1	11	1,455635	0,9786995	1,1256482
12934	Dpysl2	14	1,454976	1,8530359	1,059894
207683	Igsf11	16	1,454441	1,4147114	1,6441144
76686	Clip3/Clipr-59	7	1,453326	1,5150106	1,4771117
15894	Icam1/intercellular adhesion molecule 1/ intercellular cell adhesion molecule-1	9	1,452436	1,3980845	1,2599529
11747	Anxa5/annexin A5/Annexin V	3	1,444892	1,3234011	1,4235303
16885	LIMK1	5	1,438498	1,2281368	1,0839985
12827	Col4a2	8	1,436133	1,6443918	1,1910509
19229	Ptk2b/PYK2/Raftk	14	1,436124	1,3181414	1,0018487
16878	Lif	11	1,428697	1,2951466	0,9953048
18612	ETV4/Pea-3/Pea3	11	1,426633	1,2020122	0,8096956
67731	Fbxo32/MAFbx/atrogin/atrogin-1	15	1,426167	1,6953126	1,2539793
13036	Ctsh/cathepsin H	9	1,425129	1,1183681	1,4429318
14063	F2rl1/Par2/Proteinase-activated receptor 2	13	1,423237	1,203621	1,0968031

27226	Pla2g7/Lp-PLA2	17	1,42031	1,0261336	1,0076317
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
11490	Adam15/metargidin	3	1,420038	1,3776183	1,1441053
15396	HOXA11	6	1,419866	1,0116207	1,3774381
19016	Pparg/peroxisome proliferator-activated receptor gamma	6	1,417636	1,6823286	2,2207732
12368	Casp6/caspase-6	3	1,415778	0,9736974	1,4400689
22414	WNT2B	3	1,414752	0,9479802	1,0451901
69219	Ddah1	3	1,413442	1,2270967	1,3057774
22329	Vcam1	3	1,411308	1,2593161	1,1497794
14462	Gata3	2	1,410952	1,0940473	1,2322919
14461	Gata2	6	1,409428	1,0008219	1,0249802
53415	Htatip2	7	1,408855	1,4243459	1,3771919
19252	DUSP1/MKP1/MKP-1	17	1,405814	1,1899521	1,5624943
21943	Tnfsf11/rankl	14	1,405813	0,9165657	1,1852841
11482	Acvrl1/ALK1	15	1,404055	1,4660665	1,7087009
26417	MAPK3/p44/42 mitogen-activated protein kinase/Erk1	7	1,395526	1,1331983	1,5957078
13003	Vcan/versican	13	1,395306	1,0695729	1,1722566
21929	Tnfaip3/A20	10	1,394462	1,2608989	1,0279332
21928	Tnfaip2/M-sec/B94	12	1,394442	1,1100913	1,014022
105450	Mmrn2	14	1,394207	1,1589781	1,0577007
12064	Bdnf	2	1,384283	1,6247709	1,3973435
21803	Tgfb1/transforming growth factor-β1	7	1,378658	0,979826	1,207459
78560	Gpr124	8	1,378047	0,8984201	0,8821637
54611	PDE3A/Phosphodiesterase type 3A	6	1,37306	1,1396452	1,5292571
22762	Zfpm2/FOG2	15	1,372799	1,2508112	1,1228271
15394	Hoxa1	6	1,367128	1,448815	1,3668222
11534	Adk/adenosine kinase	14	1,364321	1,1483805	1,0788103
12578	Cdkn2a/p16	4	1,360953	0,7232065	1,2717668
11492	Adam19/Meltrin beta	11	1,360321	1,3838992	1,1937405
81877	Tnxb/Tnx	17	1,360295	1,406843	1,1244674
20723	Serpinb9/Proteinase inhibitor 9/PI9	13	1,35454	1,3462436	1,8280101
109624	Cald1/caldesmon 1	6	1,352704	1,3895302	1,0293552
20563	Slit2/slit-2	5	1,350975	1,372405	1,5154198
20304	Ccl5	11	1,349257	1,2916196	1,0982892
140484	Pofut1/Protein O-Fucosyltransferase 1	2	1,346667	1,3415464	0,9768019
54324	Arhgef5	6	1,340068	1,3336908	1,1376313
15902	Id2	12	1,338562	1,1311505	1,2431838
74199	Vit	17	1,335451	1,1564534	1,2158352
15212	HEXB	13	1,335187	1,0766608	1,3259829
14170	Fgf15/FGF19	7	1,33447	0,8384847	0,8830068
27059	SH3D19	3	1,332331	1,1945007	1,1667962
16669	Krt19/keratin 19	11	1,330303	1,2139452	1,2227821
14179	Fgf8	19	1,325749	0,9686115	1,1392515
18081	Ninj1	13	1,32467	1,0728625	1,0768811
17069	Ly6e	15	1,324492	0,8028102	1,1373041
22420	WNT6	1	1,323052	1,0910274	0,9269178
13822	Epb4.1l2/4,1G	10	1,320215	1,4271203	1,0880156
333883	Cd59b	2	1,320119	1,1486851	1,1664307
106759	Ticam1/TRIF	17	1,319976	1,1042009	1,3148429
16423	Cd47	16	1,318502	1,1313952	1,4450109
20204	Prrx2	2	1,317991	1,1741202	1,5206229
26397	Map2k3/MKK3	11	1,317882	1,3024918	0,9349556
20196	S100A13	3	1,317738	1,2401114	1,4457899
11752	Anxa8	14	1,315215	1,3734236	1,2308549
68588	CTHRC1/collagen triple helix repeat containing 1	15	1,3146	2,1661794	1,8367192
13838	Epha4	1	1,314417	1,4914381	0,9170739
79362	Bhlhe41/BHLHB3/Sharp1/Sharp-1/DEC2	6	1,313964	1,658641	0,9037128
22416	Wnt3a	11	1,312036	1,0556765	1,0053951
16410	Itgav/alphav-integrin	2	1,307944	1,5138878	1,2425827
12977	Csf1/MCSF	3	1,306679	1,2653297	1,2730509

18552	Pcsk5/PC5/6	19	1,306552	1,1125082	1,054313
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
121021	Cspg4	9	1,305981	1,5006506	1,1670629
23876	Fbln5/fibulin-5	12	1,303258	1,4214723	1,752373
229474	Fhdc1	3	1,299814	1,3227153	1,0790432
14268	Fn1/Fn/fibronectin 1/fibronectin	1	1,286295	1,4997594	1,3051169
68606	Ppm1f	16	1,281212	1,411637	0,9545471
15412	HOXB4	11	1,273772	1,1726467	1,377361
78334	CDK19	10	1,269776	1,0424956	0,6568757
14159	Fes	7	1,252216	1,3137096	1,1488035
109689	Arrb1/β-Arrestin-1	7	1,251454	1,5894835	1,0582204
22390	Wee1	7	1,248198	1,3006711	0,6729659
16412	Itgb1	8	1,233903	1,821393	1,0929075
13642	Efnb2/ephrin B2	8	1,230409	1,3596374	0,6117319
107951	CDK9	2	1,23009	1,6371521	0,6327662
277360	Prex1	2	1,214224	1,5583285	1,3701477
20720	Serpine2/PAI-1/Protease nexin-1/PN1	1	1,213144	1,3597796	1,1567264
50490	Nox4	7	1,211601	1,7353728	1,7047908
12359	CAT	2	1,210831	1,5820117	1,306867
15559	HTR2B/5-HT2B/Serotonin 2B receptor	1	1,208861	1,3146144	1,3320915
13821	Epb4.1l1	2	1,208072	1,4178658	0,9464128
110749	CHAF1B	16	1,206701	0,5710295	0,3702871
98496	PID1/NYGGF4	1	1,205599	1,1070286	1,5604011
50883	CHEK2/CHK2/Cds1	5	1,197885	0,9351196	0,6196477
65970	Lima1/Eplin	15	1,195196	1,6910367	1,2028974
12577	CDKN1C/p57/p57Kip2	7	1,194563	1,1752077	1,6802987
19713	Ret	6	1,192536	1,4377133	1,4047845
58994	SMPD3	8	1,191911	1,1771034	1,8540899
56811	Dkk2	3	1,191272	0,9198332	1,0553891
18186	Nrp1/neuropilin-1/neuropilin 1/NP-1	8	1,18904	1,6162149	1,1808241
19876	Robo1	16	1,187833	1,4094224	1,2321209
12387	Ctnnb1/β-Catenin	9	1,186638	1,3536919	0,8596866
13007	Csrp1/CRP1	1	1,172286	1,516126	0,8104329
69745	POLD4	19	1,171088	1,1203485	1,4590791
192897	Itgb4/integrin β4	11	1,171026	0,6803091	0,8431653
66934	DSN1	2	1,168731	1,3574866	0,6070885
11491	Adam17	12	1,166436	1,3356026	1,0456916
109711	Actn1/α-actinin1	12	1,164767	1,4471157	0,8333094
73379	Dcbld2	16	1,164343	1,5279591	0,9932993
52276	CDCA8	4	1,163148	0,8641729	0,4856871
76568	Ift46	9	1,160311	1,3946683	0,9828641
53869	RAB11A	9	1,160306	1,217528	1,4483518
20742	Spnb2/Sptbn1/β2-spectrin	11	1,154176	1,5090297	1,1339143
16324	Inhbb	1	1,148386	1,0402654	0,7794008
103733	TUBG1	11	1,146316	0,8491454	0,6072439
18647	CDK14/Pftk1	5	1,143955	1,0659733	1,412094
217866	Cdc42bpb	12	1,138311	1,383	0,8299571
70417	Megf10	7	1,137585	2,2151308	1,0098023
71461	Ptk7	17	1,136593	1,336583	1,078309
19367	RAD9/Rad9a	19	1,134213	0,8054202	0,6558864
13169	Dbnl	11	1,12981	1,6888383	1,0283143
18140	UHRF1	17	1,126397	0,7503235	0,2837639
71878	FAM83D	2	1,125592	1,0794929	0,6979775
52118	Pvr	7	1,125393	1,4424531	0,9454512
16176	Il1b/interleukin 1 beta	2	1,122702	1,6637023	0,8951385
16691	Krt8/cytokeratin 8/keratin 8	15	1,120826	1,3246801	1,0112391
57257	Vav3	3	1,111762	0,6687839	0,6474288
20750	Spp1/secreted phosphoprotein 1	5	1,108814	0,5193613	0,7202292
23828	Bves/Popdc1/Pop1	10	1,108486	1,300456	1,2006882
236539	PHGDH	3	1,105471	0,8065574	0,6822143

17217	MCM4	16	1,103473	0,7970515	0,6008016
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
19294	Pvrl2/nectin-2	7	1,103308	1,3534096	1,0539184
23834	CDC6	5	1,101803	0,6109849	0,3794052
17216	MCM2	6	1,097366	0,6719738	0,4998522
17535	MRE11A/MRE11	9	1,097219	1,0668646	0,6746505
67177	CDT1	8	1,096741	0,8212253	0,4197899
68339	Ccdc88c	12	1,096711	1,7855192	1,2413933
66442	SPC25	2	1,096603	0,7662725	0,6389644
15117	Has2	15	1,096448	1,4392557	1,0272883
66917	CHORDC1	9	1,094474	1,0932291	1,4300202
20740	Spna2/Sptan1/alpha-II spectrin	2	1,092811	1,3633731	0,967874
11820	App/Abeta42/Abeta/amyloid beta (A4) precursor protein	16	1,092339	1,5081652	1,3426466
21894	Tln1/Talin1	4	1,0913	1,3008544	0,9450009
235041	Kank2	9	1,08924	1,5150951	1
11518	Add1	5	1,081259	1,4569403	0,8370314
76843	DTL	1	1,08029	0,652444	0,4344047
21825	Thbs1	2	1,08007	1,6711308	0,9210053
71988	ESCO2	14	1,079504	0,7823673	0,6863086
233651	Dchs1	7	1,078839	1,3612263	1,6615428
67967	POLD3/P66/P68/DNA polymerase delta	7	1,075751	0,7449527	0,5510174
226409	ZRANB3	1	1,075169	0,8601595	0,6951503
13018	CTCF	8	1,07439	1,1134758	0,6766995
268902	Robo2	16	1,074015	1,8918882	0,8292147
12569	Cdk5r1	11	1,072554	1,6801517	1,4503785
15183	Hdac3	18	1,071015	1,4133835	0,8783189
66468	SKA1	18	1,070984	0,7037439	0,6149021
20778	Scarb1	5	1,070626	0,6761516	0,8530125
83436	Plekha2/TAPP2	8	1,06751	1,3124217	0,7865924
223775	PIM3	15	1,065891	1,1407128	0,6631036
20345	Selplg/PSGL-1/CD162	5	1,057811	1,3188567	1,0194421
19650	RBL1/p107	2	1,057253	0,805609	0,5657698
235559	TOPBP1	9	1,056957	0,9489686	0,5763667
54635	PDGFC	3	1,054256	1,5117281	1,4311789
20713	Serpini1/neuroserpin	3	1,053124	1,3899432	1,3769844
22330	Vcl/Vinculin	14	1,052626	1,3816813	0,9388947
269582	CLSPN	4	1,050073	0,5762986	0,4866014
68999	ANAPC10	8	1,048443	0,9625874	1,6673026
12835	Col6a3	1	1,047003	0,7769717	0,9031318
20877	AURKB	11	1,046347	0,7055913	0,4992519
20963	Syk	13	1,039044	1,5133453	0,9318823
211651	FANCD2	6	1,036877	0,7798329	0,5747098
73139	CENPV	11	1,036048	1,0049727	0,696978
56742	PSRC1	3	1,035685	1,1039259	0,6789971
77065	INTS7	1	1,035657	0,8766986	0,6938148
66140	Ska2	11	1,035539	1,0612632	0,6839061
12534	CDK1	10	1,032937	0,7303446	0,4759176
14234	Foxc2	8	1,030829	0,6993478	1,263952
67896	Ccdc80	16	1,030633	1,5959533	1,505108
17756	MTAP2/Map2/MAP-2	1	1,027635	1	1,7993044
17218	MCM5	8	1,026015	0,6861058	0,4864796
67121	MASTL	2	1,025987	0,7384885	0,6041356
14369	FZD7	1	1,025903	1,0452634	1,3730129
17886	Myh9	15	1,021049	1,4030669	0,7754499
51885	TUBGCP4	2	1,021044	1,0328949	0,6966401
83964	Jam3	9	1,017233	1,5400366	1,4753498
17220	MCM7	5	1,015782	0,5911604	0,5699337
70383	COX10	11	1,015454	1,0013174	0,6739054
102423	HINFP	9	1,013305	1,3104717	0,6818294
59003	Maea	5	1,011869	1,3498191	0,9135885

12544	CDC45	16	1,011054	0,5922759	0,529966
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
83383	Tfap4	16	1,010335	0,7160214	0,5604854
67166	ARL8B	6	1,009515	0,9811978	1,3116862
15201	HELLS/PASG	19	1,00866	0,7630272	0,39955
69885	Clhc1	4	1,008207	0,7942705	0,5782571
230784	SESN2	4	1,007767	0,9316563	0,4879332
17685	MSH2	17	1,007321	0,7403956	0,488117
77579	MYH10/nonmuscle myosin/NM II-B/nonmuscle myosin IIB	11	1,005246	1,0030576	0,6076431
13605	ECT2	3	1,00359	0,7624856	0,3663048
12816	Col12a1	9	1,002266	2,1908565	2,2003896
17279	MELK	4	1,00039	0,5700831	0,3945261
15139	Hc	2	1	1,0144017	1
17215	MCM3	1	0,999021	0,6254441	0,4407269
16362	IRF1/IRF-1	11	0,99733	1,0576044	0,6803435
234094	Arhgef10	8	0,997244	1,3710019	1,0438718
170731	MFN2/mitofusin 2/mitofusin-2	4	0,996416	1,3423113	0,6595575
19360	RAD50	11	0,994817	0,7831042	0,6660792
12447	CCNE1	7	0,988983	0,6290745	0,4784051
12452	CCNG2	5	0,988291	1,0933812	1,4483917
93892	Pcdhb21	18	0,987198	1,4003371	0,9847419
50791	Magi2	5	0,98651	1,0180749	0,9371784
212377	Mms22l	4	0,984931	0,7469635	0,5418954
16475	Jub/Ajuba	14	0,982982	1,5003607	0,91058
72119	Tpx2	2	0,981503	0,6781339	0,5010484
18817	Plk1/polo-like kinase 1/Plk-1	7	0,98119	0,5547678	0,4365195
16579	Kifap3	1	0,98087	1,5088735	1,2792675
13837	EPHA3/Cek4/Mek4/Tyro4	16	0,980625	1,240343	2,1141704
327762	DNA2	10	0,980357	0,8323752	0,6553674
13860	Eps8	6	0,979587	0,5984274	0,7178303
66977	NUF2	1	0,979263	0,751591	0,5885353
240087	MDC1	17	0,977353	0,8116048	0,6136238
105988	Espl1	15	0,973294	0,6065137	0,5129265
67141	Fbxo5	10	0,972919	0,512592	0,3779473
66671	CCNH/cyclin H	13	0,970398	0,6811986	1,3504779
235072	SEPT7	9	0,969473	1,0360839	1,5037795
12176	BNIP3	7	0,961321	1,4377985	1,4827357
17258	Mef2a	7	0,958173	1,4590015	1,0122773
17151	CCNDBP1	2	0,957924	1,1996218	1,490908
12189	BRCA1	11	0,957644	0,7840722	0,4694205
30939	PTTG1	11	0,957151	0,8289065	0,6694863
20957	SYCP1/SCP1	3	0,953635	1,2869618	1,3069957
16765	STMN1/stathmin 1	4	0,951628	0,7905649	0,6213131
320209	DDX11	17	0,951605	0,7890639	0,6377796
14211	SMC2	4	0,948023	0,8518849	0,6099849
210711	Mcmbp	7	0,947259	0,9127331	0,6768191
235574	Atp2c1/SPCA1	9	0,944377	1,5869231	0,9493983
12144	BLM	7	0,94287	0,8686305	0,6946541
68755	CGRRF1	14	0,942381	1,1845166	1,3107723
69928	APITD1	4	0,94214	0,7915703	0,5691636
17219	MCM6	1	0,940293	0,5654509	0,4018478
67037	PMF1	3	0,94008	0,6726505	0,6561202
16551	KIF11	19	0,938552	0,7448234	0,3218258
217653	Mis18bp1	12	0,9381	0,6832195	0,6605446
12421	RB1CC1/RB1-inducible coiled-coil 1/FIP200	1	0,938067	1,0573269	1,3076064
12545	CDC7/Cell division cycle 7	5	0,938051	0,6880938	0,4886694
22367	VRK1	12	0,937889	0,8324115	0,6301917
11799	Birc5/survivin	11	0,935996	0,6279278	0,4887904
66898	Baiap2l1	5	0,93521	1,3253424	1,2126763
13052	Cxadr/coxsackie virus and adenovirus receptor/CAR	16	0,93469	0,5328687	0,5030393

12615	Cenpa	5	0,933434	0,6515863	0,5081261
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
108912	CDCA2	14	0,932383	0,7426784	0,5026151
66634	MCM8	2	0,929228	0,7616046	0,6715166
328580	Tubgcp6	15	0,928438	1,3468429	0,5111838
67849	CDCA5	19	0,928204	0,7177615	0,5019682
68298	NCAPD2	6	0,92635	0,835212	0,5226039
26909	EXO1	1	0,92316	0,5535405	0,4258104
51944	knstrn	2	0,923091	1,0369494	0,4159851
108000	CENPF/Lek1	1	0,92075	0,6430653	0,4139713
104156	ETV5/ERM	16	0,918246	0,5870908	0,5297319
233406	PRC1	7	0,91786	0,7607093	0,3979533
107995	CDC20	4	0,917514	0,8099503	0,508028
76044	NCAPG2	12	0,914239	0,5679632	0,4242953
18576	Pde3b	7	0,908647	0,5766719	0,4591035
18763	Pkd1/polycystin-1	17	0,908339	0,9560258	0,6934327
12053	Bcl6/LAZ3	16	0,905834	1,6080765	0,9531183
70385	Spdl1	11	0,904963	0,7853245	0,6400466
218977	DLGAP5/Dap-5	14	0,902621	0,7899506	0,563395
16800	Arhgef2/GEF-H1/Lfc	3	0,899438	1,3292814	0,7337314
230376	HAUS6	4	0,898778	0,7075054	0,669719
15242	HHEX/Hex/hematopoietically expressed homeobox	19	0,897668	1,19847	1,3930152
69716	TRIP13	13	0,896556	0,7564616	0,3998799
71819	Kif23/MKLP1	9	0,893096	0,5956657	0,4911861
215387	NCAPH	2	0,892825	0,6586798	0,4502658
76454	FBXO31	8	0,892266	0,8259617	0,6472667
70218	KIF18B	11	0,887133	0,7471271	0,5512837
52679	E2F7	10	0,886741	0,7222688	0,6264643
404710	IQGAP3	3	0,886055	0,9935016	0,6008289
60530	FIGNL1	11	0,885578	0,822057	0,4827256
228421	Kif18a	2	0,884717	0,6867163	0,6046833
73804	Kif2c	4	0,884	0,691906	0,3618352
66953	CDCA7	2	0,883186	0,7708751	0,5022584
12235	BUB1	2	0,883011	0,6443345	0,3707107
12035	BCAT1/BCATc	6	0,882077	0,8796505	0,6012591
12823	Col19a1/Collagen XIX	1	0,88163	1,3034938	1
68743	ANLN/Scraps	9	0,880253	0,6461487	0,4089922
12649	Chek1	9	0,879484	0,5242387	0,486635
16319	INCENP	19	0,878479	0,6717136	0,4244519
99100	CEP152	2	0,877142	0,8796286	0,6712434
18973	POLE	5	0,876107	0,6708524	0,4529117
12236	BUB1B/BUBR1	2	0,875163	0,6125089	0,3548661
74192	Arpc5l	2	0,874316	0,6870207	1,0751974
12532	CDC25C/Cdc25	18	0,874153	0,6713955	0,5318599
16881	LIG1	7	0,873149	0,6130992	0,5352439
219072	Haus4	14	0,870715	0,661614	0,8935859
74107	CEP55	19	0,868989	0,7821578	0,5877927
18974	POLE2	12	0,868699	0,6068746	0,5970709
72415	Sgol1	17	0,866472	0,5156146	0,5428187
80986	CKAP2	8	0,864631	0,9185482	0,6507346
67629	SPC24	9	0,859363	0,6821768	0,6677156
16553	KIF13A	13	0,856806	0,9845107	0,6239061
54141	Spag5	11	0,854078	0,5732473	0,4284425
18005	NEK2	1	0,853996	0,8988498	0,460395
19075	PRIM1	10	0,851177	0,4516606	0,4160399
20878	AURKA	2	0,844915	0,6267479	0,5392339
240641	KIF20B/Mphosph1/magoo	19	0,843894	0,5688592	0,4472116
19645	Rb1	14	0,843292	1,3093984	1,3838221
20873	Plk4	3	0,842499	0,539118	0,5995954
67052	Ndc80	17	0,84158	0,6665938	0,5144326

56047	Msln	17	0,841432	0,6181665	0,5992362
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
54392	NCAPG	5	0,840205	0,7396327	0,4485298
21335	TACC3	5	0,839772	0,9071741	0,5238036
219114	Ska3	14	0,839633	0,5526198	0,5818008
102774	BBS4	9	0,838775	0,7210794	0,6867889
18952	SEPT4	11	0,838532	0,8038245	0,6317813
208628	KNTC1	5	0,837437	0,8236481	0,5640029
17865	Mybl2/B-Myb	2	0,83607	0,5700661	0,6337366
74256	Cyld	8	0,835705	1,5263825	0,8341
229841	CENPE	3	0,835106	0,7100204	0,4397197
12428	CCNA2/cyclin A2	3	0,830835	0,5633266	0,468754
26934	Racgap1/MgcRacGAP	15	0,830527	0,5866953	0,4271197
21749	Terf1/TRF1	1	0,829704	0,6198464	0,8268442
93878	Pcdhb7	18	0,828421	0,6646082	0,8116611
71846	SYCE2	8	0,828053	0,6480224	0,6472411
19361	RAD51	2	0,826963	0,6952428	0,3966352
17427	MNS1	9	0,821534	0,6364193	0,5991903
21808	TGFB2	1	0,811884	1	1,5015988
327799	USP44	10	0,810151	1,0752171	1,3244254
105837	MTBP	15	0,810108	0,7125554	0,6421641
26920	CEP110/Cntrl/centriolin	2	0,809386	0,8673678	0,5711652
12190	Brca2	5	0,80609	0,6569492	0,5701443
209462	HACE1	10	0,804045	1,1041961	0,6921405
101565	Ccp110	7	0,79778	0,860646	0,6096507
72107	DSCC1	15	0,793128	0,4705079	0,4675378
208846	Daam1	12	0,788596	1,3558584	0,7740869
242705	E2F2	4	0,785717	0,7841843	0,64923
237436	GAS2L3	10	0,782952	1,0588104	0,5888831
382090	cep162		0,781455	0,7742692	0,6469118
12704	CIT	5	0,780707	0,9754396	0,5951041
12316	ASPM	1	0,770173	0,6510521	0,4842564
77963	HOOK1	4	0,76804	0,7374652	0,6162294
76464	Casc5	2	0,765319	0,576928	0,3587922
78733	Troap	15	0,763181	0,6603781	0,6913264
14841	GSG2	11	0,761868	0,820661	0,5391109
30928	Zfp238/Rp58	1	0,76036	1,3168032	0,8791092
16332	Inppl1/SHIP2/SHIP-2	7	0,754434	1,4870641	0,8436018
17345	MKI67/Ki-67	7	0,752431	0,5813922	0,3767762
77011	Ticrr	7	0,749549	0,5404498	0,5614311
18040	Nefm	14	0,727072	0,3706067	0,6461656
23969	Pacsin1	17	0,705966	0,5326984	0,4650962
231148	Ablim2	5	0,6999	0,6811993	0,7447789
12442	CCNB2	9	0,699807	0,6097882	0,5512112
12801	Cnr1	4	0,698092	0,8962488	0,7136205
16776	Lama5	2	0,695171	0,7733602	0,6637602
57373	Akip1	7	0,69481	0,5923166	1,001092
11539	Adora1/Adenosine A1 receptor/A1 adenosine receptor	1	0,694123	1,0515925	1,2140168
17988	NDRG1/RTP/Drg1/Cap43/rit42/TDD5/Ndr1	15	0,694011	0,6472205	0,5544359
13982	ESR1/estrogen receptor-α	10	0,693701	0,7582584	0,7683776
108699	CHN1	2	0,692017	0,8561903	1,3631074
14180	Fgf9	14	0,689553	0,7819629	0,7495205
18039	Nefl/NF68	14	0,688303	0,2125516	0,4211404
13610	S1pr3/sphingosine-1-phosphate receptor 3	13	0,686651	0,5646593	0,4053004
73713	Rbm20	19	0,683351	1,0671715	0,949925
229285	SPG20	3	0,681863	1,0681283	1,1669751
14537	Gcnt1/core 2 n acetylglucosaminyltransferase	19	0,678657	0,7030803	0,7191579
53620	Vamp5/vesicle-associated membrane protein 5	6	0,676422	0,7469118	1,0882445
11689	Alox5/5-lipoxygenase	6	0,673976	0,6920593	0,3926233
21987	TPD52L1	10	0,671402	0,7074001	0,6473913

26903	Dysf/dysferlin	6	0,669619	1,0682955	1,0450616
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
104252	Cdc42ep2/CEP2	19	0,658177	1,3229618	0,964467
24063	SPRY1/sprouty1	3	0,655175	0,960412	0,7334131
22422	Wnt7b	15	0,654859	0,8900679	0,7825536
21956	Tnnt2	1	0,646912	0,8600875	0,9189365
20192	Ryr3/ryanodine receptor 3	2	0,645851	1,598639	1,4743676
22393	WFS1	5	0,64563	0,5724624	0,6684425
329828	AI464131/Net37	4	0,635038	1	0,7916252
14360	FYN	10	0,633517	0,8079238	1,1722656
12373	Casq2	3	0,629381	1,511394	0,9918135
75547	Akap13/AKAP-Lbc	7	0,625677	1,1822417	1,0215785
105855	Nckap1l	15	0,620522	0,5922694	0,6729985
433766	Trim63/MuRF1	4	0,616233	1,1454251	1,3220486
21957	Tnnt3	7	0,614793	0,7895067	0,9704724
235542	Ppp2r3a	9	0,610745	0,6634531	0,9003716
320910	Itgb8/Beta8 integrin	12	0,608954	0,4756731	0,2573476
14154	Fem1a	17	0,603038	0,7256376	0,8914418
57339	Jph1/JP-1/Jp1/Junctophilin 1	1	0,599624	0,9782603	1,0136935
13845	Ephb3/Hek2/MDK5/Sek4	16	0,599407	0,7766329	1,2501438
68016	Murc	4	0,593078	0,909305	0,9609599
20661	Sort1/sortilin 1	3	0,590768	1,0545577	1,0099103
27428	Shroom3	5	0,585931	0,6903283	0,9172926
16420	Itgb6	2	0,585737	0,8810835	1,3359234
69737	Ttl/tubulin tyrosine ligase	2	0,585637	0,5317384	0,9040144
21809	TGFB3/Transforming Growth Factor-Beta 3	12	0,581653	1,0779932	1,3139656
21952	Tnni1/ssTnI	1	0,57975	0,7251895	1,0173123
11932	Atp1b2/Na,K-ATPase subunit beta2/beta 2- subunit of the Na, K-ATPase	11	0,578268	0,6823836	0,5553715
18003	NEDD9	13	0,574828	0,7390948	0,4522173
18128	Notch1	2	0,572146	0,6199513	0,5519521
15258	Hipk2/homeodomain interacting protein kinase 2	6	0,570457	0,5019007	0,5446515
75033	Mei4	9	0,568157	0,5767755	0,5298428
225288	Fhod3/Formin-g/Fhos2	18	0,560714	0,8120224	1,0768784
56188	Fxyd1/phospholemman	7	0,547621	0,5127662	0,5203587
320343	Lypd6	2	0,54137	0,5442059	0,4619292
53376	Usp2	9	0,536283	0,809157	0,7856138
107351	Kank1	19	0,532413	0,9361023	1,2360095
53318	Pdlim3/ALP	8	0,530742	0,9513916	0,9711327
17700	Mstn	1	0,528647	1,2978505	1,8861624
16322	Inha/inhibin α	1	0,527594	0,6514385	1,1627947
17901	Myl1/MLC1f/fast Myosin light chain 1/MLC3f	1	0,52661	0,7481256	1,0319148
22437	Xirp1/xin	9	0,526381	0,8567211	1,1025207
235281	Scn3b	9	0,523473	0,5883641	0,8189063
21955	Tnnt1	7	0,522806	0,8210952	0,8821488
98660	Atp1a2/Na,K-ATPase α2-isoform/Na(+)/K)+)-ATPase α2-isoform	1	0,519232	0,5584359	0,6016276
57278	Bcam	7	0,513867	0,566737	0,667521
13867	Erbb3	10	0,513564	0,9359637	0,8969816
20356	Sema5a	15	0,507334	0,6227246	0,6190508
76469	Cmya5/Myospryn	13	0,50378	0,6701839	0,517315
12180	Smyd1/Bop	6	0,494317	1,158623	0,728356
17260	Mef2c	13	0,475389	0,6711597	0,8236576
17996	Neb	2	0,472445	0,8684569	1,062809
20190	Ryr1/ryanodine receptor 1	7	0,466424	0,9146265	1,1012833
116904	Alpk3	7	0,444811	0,8130519	0,8248201
17930	Myom2	8	0,439816	1,0069861	0,801908
68802	Mypn/Myopalladin	10	0,438611	0,9499635	1,1230888
14177	Fgf6	6	0,434558	0,6921988	1,0016197
12391	Cav3	6	0,430054	0,6603959	1,0344288
11937	Atp2a1/SERCA1	7	0,423356	1,3007758	0,8203474

77125	Il33/interleukin 33/IL-33	19	0,416749	0,3695747	0,319746
Gene number	Name	chromosome	Ratio m2_0h	Ratio m2_12h	Ratio m2_24h
238161	Akap6/mAKAP	12	0,410872	0,905554	0,9809875
11423	Ache	5	0,403738	0,6770249	0,4344757
17906	Myl2	5	0,403723	0,2845475	0,5741954
16011	Igfbp5/IGFBP-5	1	0,403524	0,3814173	0,2398687
21953	Tnni2	7	0,399032	0,5184087	0,7368291
216459	Myl6b/MLC1SA	10	0,387227	0,7863862	0,7420664
56012	Pgam2	11	0,384846	0,715344	1,1027767
114301	PALMD	3	0,383323	0,8182255	1,3182006
16401	Itga4/integrin α4	2	0,38054	0,6468986	0,8052636
12323	CAMK2B/CaMKIIβ	11	0,360639	0,3946506	0,3970889
19091	Prkg1/PKGI/cGKI/cGMP-dependent protein kinase	19	0,331472	0,6457887	0,7166784
17929	Myom1/myomesin 1/Skelemin	17	0,326906	0,6701895	0,8340212
11474	Actn3/α-Actinin-3	19	0,326501	0,5874857	0,7348722
22061	TRP63/p63	16	0,322221	0,4420615	0,4719714
17189	Mb	15	0,313368	0,4706504	0,8442141
319713	Ablim3	18	0,303955	0,4580005	0,8089261
17882	Myh2	11	0,302995	0,3811826	0,5924922
242022	Frem2	3	0,296798	0,421212	0,6480015
11472	Actn2/α-Actinin2/alpha-actinin 2	13	0,29533	0,5048825	0,9554915
12372	Casq1/calsequestrin-1	1	0,283159	0,4194102	0,5425579
434246	Trim72/MG53	7	0,273586	0,6089488	0,7735769
12292	Cacna1s/Cchl1a3/Cav1.1	1	0,267209	0,4442293	0,8009003
21393	Tcap/telethonin/titin-cap/t-cap	11	0,236153	0,3607446	0,7614426
140781	Myh7	14	0,210364	0,4364873	0,6695547
13009	Csrp3/MLP/Muscle LIM protein	7	0,191018	0,4049974	0,9190335
17879	Myh1	11	0,180525	0,417793	0,7465019
17884	Myh4/MyHC Iib/IIb MyHC	11	0,175066	0,1433277	0,1290294
17878	Myf6/herculin	10	0,144786	0,1843212	0,3162946
227580	C1ql3	2	0,132278	0,1427967	0,2157756
109272	Mybpc1/myosin binding protein-C slow	10	0,122625	0,2196365	0,385616
12491	Cd36/ fatty acid translocase	5	0,112956	0,2018263	0,373258

Résumé

La masse musculaire est largement régulée par des voies de signalisation contrôlant l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines myofibrillaires. Ainsi, la myostatine, membre de la superfamille des TGFβ, cible un certain nombre de réseaux de signalisation impliqués dans la régulation de la masse musculaire, notamment la voie de signalisation Akt/mTOR. La myostatine est un des inhibiteurs majeurs de la myogenèse en exerçant un contrôle négatif sur la prolifération et différenciation des myoblastes. A l'heure actuelle, la myostatine est au centre de nombreuses stratégies thérapeutiques notamment dans le cadre de thérapies visant à améliorer la fonction musculaire dans les cas d'atrophie ou myopathies. Les protéines GASP-1 et GASP-2, deux protéines sécrétées contenant plusieurs domaines associés à des inhibiteurs de protéases, ont été décrites comme antagonistes de la myostatine. L'Unité de Génétique Moléculaire Animale a mis en place des stratégies *in vitro* et *in vivo* afin de déterminer les fonctions des protéines GASP, notamment dans le contexte myogénique. Dans un premier temps, l'équipe a généré une lignée de souris transgéniques TgGasp-1 sur-exprimant le gène *Gasp-1*. Cette lignée présente une augmentation globale du poids des muscles squelettiques et une hypertrophie, conséquences d'une inhibition de la myostatine. Cependant, contrairement aux souris knock-out pour la myostatine (Mstn-/-), cette lignée ne présente ni d'hyperplasie, ni de changement dans la proportion des différents types de fibres musculaires, ni de variation de métabolisme.
Afin de mieux comprendre le rôle des protéines GASP dans le développement musculo-squelettique, deux approches complémentaires ont été développées au cours de cette thèse.
Une première approche *in vivo*, avec l'étude d'une lignée murine TgGasp-2 sur-exprimant le gène *Gasp-2*, a permis de mettre en évidence un phénotype musculaire semblable aux souris sur-exprimant *Gasp-1*. En effet, l'analyse phénotypique de ce modèle murin montre à 12 semaines, une augmentation globale du poids des souris et de certains muscles squelettiques due à une hypertrophie des fibres musculaires. Comme pour les souris sur-exprimant *Gasp-1*, à la différence des souris Mstn-/-, le nombre total de fibres des souris TgGasp-2 et leur métabolisme ne présentent pas de variation par rapport aux souris sauvages. Une seconde approche *in silico*, suite à une étude transcriptomique et protéomique à partir de modèles murins sur-exprimant ou non GASP-1, a permis d'identifier différents processus biologiques et voies de régulation contrôlées par GASP-1.

Mots clés : Muscle, hypertrophie, GASP, myostatine, souris

Abstract
Muscle mass is largely regulated by signaling pathways controlling the balance between synthesis and degradation of myofibrillar proteins. Thus, myostatin, a member of the TGFβ superfamily, targets a number of signaling networks involved in the regulation of muscle mass, in particular the Akt / mTOR signaling pathway. Myostatin is one of the major inhibitors of myogenesis by exerting a negative control on the proliferation and differentiation of myoblasts. Today, myostatin is involved in many therapeutic strategies which aim to improve muscle function in cases of atrophy or myopathies. GASP-1 and GASP-2 are two secreted proteins containing several domains associated with protease inhibitors, and described as myostatin antagonists. The Animal Molecular Genetics laboratory has developed *in vitro* and *in vivo* strategies to determine the functions of GASPs proteins in a myogenic context. First, we generated a transgenic mouse line TgGasp-1 over-expressing the *Gasp-1* gene. This line shows an overall increase in skeletal muscle weight and hypertrophy, a consequence of myostatin inhibition. However, unlike myostatin knockout mice (Mstn -/-), this line shows neither hyperplasia, nor change in the proportion of different types of muscle fibers. Moreover, the global metabolism is not affected. In order to better understand the role of GASPs proteins in musculoskeletal development, two complementary approaches were developed during this thesis :
(i) the study of a murine TgGasp-2 line over-expressing *Gasp-2* reveals a muscular phenotype similar to the TgGasp-1 mice. At 12 weeks, we observed an overall increase in body and some skeletal muscles weight due to a hypertrophy of the myofibers. As the TgGasp-1 mice, and unlike the Mstn -/- mice, the number of fibers and the metabolism of TgGasp-2 mice did not vary compared to the wild-type mice (ii) *In silico* analyses allow us to identify different biological processes and regulated pathways controlled by GASP-1.

Keywords: Muscle, hypertrophy, GASP, myostatin, mouse