

# GENES DU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE ET DES QUALITES DE LA VIANDE BOVINE

V. AMARGER, L. BREMAUD, D. DELOURME, F. GRANDJEAN, P. PELISSIER, P. RAYNAUD,  
L. ROUHAUD, R. JULIEN, H. LEVEZIEL

Unité de Génétique Moléculaire Animale, UMR1061, INRA/Université de Limoges, Limoges

## Introduction

Les consommateurs de viande bovine demandent de plus en plus activement aux producteurs et transformateurs des produits dont les qualités, en particulier organoleptiques ou hygiéniques, sont bien établies et constantes dans le temps. Il s'avère donc nécessaire pour mieux définir et maîtriser ces caractères, ou même les améliorer, de développer des recherches destinées à élaborer de nouveaux outils moléculaires.

Plusieurs approches peuvent être utilisées, systématiques car appréhendant l'ensemble du génome comme dans le cas des programmes de détection de QTL et de séquençage d'ADNc, ou plus raisonnées car se focalisant sur quelques gènes particuliers dont la structure et la fonction sont étudiées de manière approfondie. Plusieurs niveaux d'investigation peuvent être considérés, selon que sont mises en œuvre des méthodes d'analyse des gènes (génomique), de leurs transcrits (transcriptome), ou de leurs produits (protéome). Ces diverses approches et méthodes, souvent employées de manières alternatives ou du moins déployées de manière séquentielle, sont en réalité complémentaires. Seule leur utilisation « intégrée » conduira à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques étudiés et de leurs contrôles.

Nos travaux ont pour objectifs de contribuer à la connaissance des mécanismes, génétiques ou épigénétiques, qui seraient responsables de la variabilité génétique existante au sein des populations bovines. A cet effet, la structure, les fonctions (expression et régulation) et les polymorphismes des gènes suivants sont étudiés : (i) les gènes impliqués dans la voie de transduction du signal de la myostatine, produit du gène *GDF8*, dont des mutations déterminent dans certaines races le phénotype hypermusclé (mh), (ii) l'homologue bovin du gène *PRKAG3* dont une mutation (RN) est responsable chez le porc d'une perte de rendement au niveau de la production du jambon cuit et salé, et (iii) des gènes impliqués dans la maturation *post-mortem* du muscle en viande et contrôlant des inhibiteurs de protéases comme la calpastatine, inhibiteur des calpaïnes, ou une serpine isolée du muscle bovin, inhibitrice de sérines protéases.

## Matériel et méthodes

La partie codante des gènes étudiés a été obtenue par amplification PCR à l'aide d'amorces déduites des séquences disponibles dans les bases de données, en particulier celles issues des programmes de séquençage systématique d'étiquettes bovines (ESTs) ou des projets génomiques humain ou murin. L'étude approfondie de la structure des gènes et de leurs polymorphismes a été réalisée par RT-PCR, et par analyse de BACs et séquençage. Les BACs ont été isolés par PCR, à partir d'une banque de grands fragments d'ADN génomique bovin, au Centre de Ressources Agenae (INRA, Jouy-en-Josas).

Les échantillons biologiques (ADN génomique, ARN totaux, extraits protéiques) ont été obtenus à partir de prélèvements réalisés sur des bovins abattus à l'abattoir de Limoges ou à l'abattoir expérimental du Centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix. Des échantillons d'ADN génomique d'animaux génotypés (porteurs de mutations ou non) pour le gène *GDF8* et de phénotypes caractéristiques (fort développement musculaire ou non), en particulier de race Bazadaise, ont été sélectionnés par F. Ménéssier (SGQA, INRA, Jouy-en-Josas) et mis à notre disposition par LABOGENA (Jouy-en-Josas). L'anticorps anti-myostatine a été produit par Agro-Bio (La Ferté St Aubin) en immunisant un lapin avec un peptide recombinant produit dans notre laboratoire. Les anticorps anti-calpastatine et anti-serpine, produits respectivement contre un peptide de synthèse et contre l'anti-protéase purifiée, nous ont été fournis par A. Ouali (SRV, INRA, Theix).

## Résultats

### Identification de nouveaux gènes impliqués dans le fort développement musculaire des bovins.

Diverses mutations du gène *GDF8* sont responsables d'une hypertrophie musculaire (Grobet *et al.*, 1997) due à une augmentation du nombre de myoblastes lors du développement embryonnaire. Cependant, dans diverses populations bovines, des animaux présentant un développement musculaire remarquable ne possèdent aucune des mutations connues de *GDF8*. De ce fait, d'autres gènes, notamment ceux impliqués dans la voie de transduction du signal de la myostatine, pourraient intervenir dans le développement musculaire. Ainsi, deux approches complémentaires sont développées :

- l'étude de deux gènes candidats : (i) *ACTRIIB* qui code une sous-unité du récepteur liant l'activine et la myostatine, deux ligands très proches, et (ii) *FST*, qui code la follistatine, une protéine susceptible d'être impliquée dans la régulation de la concentration extracellulaire de la myostatine. Ces gènes dont la structure a été établie sont prioritairement exploités pour la recherche de polymorphismes associés au phénotype de fort développement musculaire dans une population d'animaux remarquables ;

- l'utilisation de myostatine bovine recombinante et d'un anticorps anti-myostatine afin d'identifier les partenaires protéiques de la myostatine au sein de la cellule musculaire. L'un d'entre eux, isolé par immuno-

purification, sera microséquéncé et une stratégie directe de clonage des gènes correspondants sera mise en place, en préalable à l'étude des polymorphismes dans la population d'animaux remarquables sélectionnés.

### **Caractérisation du gène bovin *PRKAG3*, gène majeur de la qualité de la viande chez le porc**

Une mutation du gène (mutation RN) est responsable chez le porc d'une perte de rendement au niveau de la production du jambon cuit et salé (Milan *et al.*, 2000). Ce phénomène est dû à un taux de glycogène musculaire excessivement élevé résultant d'un changement de l'activité de l'enzyme AMPK. Cette enzyme joue un rôle clé dans le métabolisme énergétique et contrôle l'état des réserves glucidiques et lipidiques du muscle dont dépendent les caractéristiques nutritives et gustatives d'une viande. Compte tenu des connaissances acquises chez le porc, une étude des gènes codant les différentes sous-unités de l'enzyme AMPK a été entreprise dans le muscle bovin.

Le gène bovin *PRKAG3*, codant une isoforme spécifique du muscle squelettique de la sous unité régulatrice  $\gamma$  de l'AMPK, a été entièrement séquencé et divers polymorphismes affectant la composition de la protéine ont été mis en évidence. Il convient maintenant d'établir une corrélation entre ces polymorphismes, la structure et l'activité de la protéine, et d'éventuelles caractéristiques de la viande bovine.

### **Gènes et maturation post mortem des viandes bovines**

Nos travaux portent sur deux systèmes protéases/anti-protéases :

**Le système calpaïne-calpastatine** : la calpastatine, inhibiteur des calpaïnes, régule l'activité des protéases. Elle intervient au cours de la protéolyse typique de la maturation des viandes. Plusieurs transcrits du gène *CAST*, codant la calpastatine, ont été décrits chez les bovins, ovins ou porcins, mais ces données demeurent préliminaires en l'absence d'une connaissance précise de la structure du gène. Chez l'homme, le gène comporte au moins 28 exons répartis sur plus de 80 kb. Une étude du gène bovin a été entreprise pour établir sa structure, à partir de l'analyse des transcrits et à partir de l'analyse de BACs. La structure du gène bovin, établie par notre laboratoire, comporte au moins 34 exons et s'avère très comparable à celle du gène humain. Plusieurs épissages alternatifs jamais décrits auparavant ont été identifiés. La recherche de polymorphismes est engagée et les travaux consisteront à établir les liens avec l'existence d'isoformes protéiques pouvant avoir des activités inhibitrices variables.

**Le système sérine protéases-serpines** : l'étude moléculaire d'un inhibiteur de sérine protéase, purifié et caractérisé à partir de muscle squelettique bovin par l'équipe de A. Ouali (INRA, SRV, Theix), a été entreprise. Le gène codant cet inhibiteur, de la famille des serpines, a été identifié et séquencé. Il est constitué de 4 exons et 3 introns, et l'étude des régions promotrices est actuellement en cours. L'organisation structurale, identique à celle du gène codant la serpine A3 humaine (*SERPINA3*), suggère qu'il appartient comme chez l'homme à une famille multi-génique. L'étude des ARN révèle la présence d'un seul type de transcrit s'exprimant dans le muscle. A l'inverse, plusieurs ARNm sont observés dans d'autres tissus. Par ailleurs, un complexe, formé entre cette anti-protéase et sa cible potentielle, est mis en évidence spécifiquement dans les muscles squelettiques. L'identification de cette protéase, de même qu'une étude de cette famille multi-génique, constituent les perspectives prioritaires dans la poursuite de ce travail

### **Conclusion**

Les travaux sont entrepris pour identifier et analyser les gènes impliqués dans le développement, la croissance et le métabolisme du muscle, et dans sa maturation *post-mortem* en viande. Nous avons acquis des informations sur des gènes (*ACTRIIB*, *FST*) de la voie de transduction du signal de la myostatine, sur le gène *PRKAG3*, homologue bovin du gène RN porcin, et sur des gènes d'inhibiteurs de protéase (*CAST* et serpine). Après avoir déterminé la structure de ces gènes, les efforts portent notamment sur la recherche de polymorphismes et pour certains (myostatine, serpine) sur la caractérisation de partenaires moléculaires. Il conviendra d'établir les relations entre ces données et les caractéristiques des muscles ou des viandes, en particulier en étudiant des animaux aux phénotypes remarquables pour les divers caractères. Nos travaux visent à élaborer des outils moléculaires utilisables dans le génotypage des reproducteurs. Ils aideront à prédire leurs performances, notamment pour la production de viande de qualité, et ils permettront la prise en compte de ces informations dans les programmes de sélection.

### **Références**

- Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménéssier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.*, 17, 71-4.
- Milan D., Jeon J.T., Looft C., Amarger V., Robic A., Thelander M., Rogel-Gaillard C., Paul S., Ianucelli N., Rask L., Ronne H., Lundstrom K., Reinsch N., Gellin J., Kalm E., Le Roy P., Chardon P., Andersson L. (2000). A mutation in *PRKAG3* associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 288, 1248-1251.

### **Remerciements**

Nous remercions les personnes ayant contribué à nos travaux en mettant à notre disposition des échantillons biologiques (F. Ménéssier, SGQA, INRA, Jouy-en-Josas ; J.F. Hocquette et R. Jailler, URH, INRA, Theix) et les anticorps anti-calpastatine ou anti-serpine (A. Ouali, SRV, INRA, Theix). P. Raynaud bénéficie d'une bourse INRA/Région Limousin et L. Rouhaud d'une bourse Région Limousin (FSE).