



Etude des isoformes du gène PGC-1 α dans le développement musculaire chez le bovin

Jessica Bamba

► To cite this version:

Jessica Bamba. Etude des isoformes du gène PGC-1 α dans le développement musculaire chez le bovin. Autre [q-bio.OT]. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : . tel-02790533

HAL Id: tel-02790533

<https://hal.inrae.fr/tel-02790533>

Submitted on 5 Jun 2020

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

EA7500-USC INRA 1061 / FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LIMOGES

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par
Jessica BAMBA FUNCK

Le 17 décembre 2018

Etude des isoformes du gène PGC-1 α dans le développement musculaire chez le bovin

Thèse dirigée par le **Professeur Véronique BLANQUET**

JURY :

Président du jury :

Ahmad OULMOUDEN, Professeur des Universités, CNRS UMR 7276, INSERM U1262, Limoges

Rapporteurs :

Jean-François HOCQUETTE, Directeur de Recherche, INRA, Theix

Philippe NOIREZ, Maître de Conférence des Universités, HDR, IRMES EA 7329, UFR STAPS, Paris Descartes

Examineurs :

Claude FOREST, Directeur de Recherche, UMR-S 1124, Paris Descartes

Laetitia MAGNOL, Maître de Conférence des Universités, EA7500-USC INRA 1061, Limoges

Véronique BLANQUET, Professeur des Universités, EA7500-USC INRA 1061, Limoges



A mes parents,

A ma sœur,

A mon mari,

A ma fille,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont apporté un soutien durant ces quatre années de thèse.

Je souhaite remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie le Dr Jean-François Hocquette et le Dr Philippe Noirez de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse, ainsi que les Dr Laetitia Magnol et Dr Claude Forest d'être les examinateurs de ma thèse.

Je remercie également le Pr Ahmad Oulmouden, merci de présider mon jury de thèse. Merci de m'avoir choisi pour travailler à vos côtés et de m'avoir encadré au début de ma thèse. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

Je voudrais chaleureusement remercier le Pr Véronique Blanquet, je remercie la directrice de laboratoire de m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je remercie également la directrice de thèse de m'avoir encadré. Merci pour tout, vous avez été présente tout au long de ces quatre années, vous m'avez fait confiance, vous m'avez encouragée et épaulée. Merci d'avoir littéralement sauvé ma thèse et de m'avoir soutenu dans mes choix personnels. Vous m'avez soutenue lorsque je vous ai annoncé l'arrivée de mon bébé, ce qui m'a permis d'appréhender les choses un peu plus sereinement.

Merci à Claude Forest, je vous remercie pour tout ce que vous m'avez appris, en cours et lors de mon stage de M2. Merci pour votre confiance, votre gentillesse et votre disponibilité. Merci de m'avoir transmis votre passion.

Merci à Philippe Noirez, aujourd'hui pour accepter de juger mon travail. Et lors de mon M2, nous avons partagé un bureau, des pauses déjeuner, des idées et des manips. Merci pour tout.

Merci à Laetitia Magnol d'accepter d'examiner mon travail et pour tous les moments passés au laboratoire.

Merci à tous les membres du laboratoire, merci Lionel et Nathalie, pour votre précieuse aide et votre disponibilité, merci Nathalie pour ton oreille attentive et tes conseils.

Merci Khaled, pour tes conseils scientifiques et nos grandes discussions.

Merci Didier, Laure et Patrick pour le temps que vous m'avez consacré et pour tous vos conseils avisés.

Merci Fabrice de m'avoir donné l'opportunité de faire mes premières armes dans l'enseignement.

Merci Anne, de m'avoir laissé envahir ton bureau, merci pour ta bonne humeur.

Merci Karine, Emilie et Fabienne pour vos conseils et votre soutien.

Merci Odile, ta gentillesse et ta bienveillance sont indispensables à ce labo.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire, pour l'aide que vous avez pu m'apporter Stéphanie, Romain, Sébastien, ainsi que les doctorants, Tiffany, Julien, Florian, Montassir, Abdelmajid, bon courage pour la suite.

Pour vouloir faire une thèse, il faut avoir rencontré sur son parcours des personnes passionnées qui nous transmettent leur soif de recherche. En ce sens je remercie toutes les professeures et tous les professeurs que j'ai pu avoir au cours de mon cursus universitaire. Un merci tout particulier à Dr Jamileh Movassat de m'avoir acceptée dans son laboratoire et encadrée pour mon stage de M1.

Merci à Dr Anissa Ilias de m'avoir guidée lors de mes premiers pas dans un laboratoire de recherche. J'applique toujours tes conseils.

Merci Dr Nolwenn Joffin, qui peut croire qu'une personnalité comme la tienne se cache derrière ton sourire angélique. Merci pour tout, nos manips, nos grandes discussions et ton amitié. Tu m'as appris ce qu'était un thésard, et tu as tellement bien rempli ta mission que j'ai voulu poursuivre en doctorat.

Ces quatre années de thèse auraient été bien différentes sans mes supers copains. Luce, tu te qualifies « d'ours mal léché », je ne t'ai jamais vu en tant que telle, bien au contraire. Merci tes conseils scientifiques et pour ton amitié. Tu as toujours le mot qui réconforte, tu réponds toujours présente.

Merci à la famille Grassot, pour les soirées passées ensemble. Vincent, merci pour nos grandes discussions scientifiques et personnelles, les parties de tarot, et la bonne humeur au labo.

Merci Amel et Carole pour tous les moments partagés ; les sorties, les soirées entre filles.

Merci Mélanie, on a ri, on a covoituré, on a passé des soirées mémorables. Merci pour tous ces moments.

Caroline et Alexis, merci pour tout, les rires, restos, les soirées, les week-ends mais aussi les grands moments d'indignation, les moments passés au labo et partout ailleurs. Ces années auraient été bien tristes sans vous. Au labo et en dehors, vous êtes formidables, merci pour votre amitié. Merci pour tout Alexis, ton soutien m'a été incroyablement précieux. Merci pour les longues heures que tu m'as accordées, à m'épauler pour les dernières manips lorsque j'étais trop enceinte (quand ton ventre touche tant le PSM que tu as du mal à attraper les pipettes, c'est le moment d'arrêter la culture !!) et toutes les relectures de ce manuscrit. Caro, on a commencé ensemble, on va finir en beauté, c'est du moins tout ce que je nous souhaite.

Un merci grand comme l'univers à mon mari, l'amour de ma vie. Je n'y serai tout simplement pas arrivé sans toi. Tu as toujours tout fait pour que tout se passe au mieux, tu m'as encouragée, rassurée, écouté. Merci d'être « parfait pour moi ». Notre fille d'amour, notre magnifique tout petit ange. Je te remercie d'être le plus parfait des bébés.

Merci à mes parents et à ma sœur, tout ce que je pourrais dire est incroyablement minimaliste face à ce que je vous aime et à ce que vous m'avez manqué ces quatre ans de thèse. Merci papa, tes yeux m'ont toujours regardé avec fierté, il suffit qu'un simple « ça va aller » pour que je sois rassurée. Merci Maman, tu m'as toujours écoutée, épaulée, rassurée. Tu es la plus parfaite des mamans, à moi d'être à la hauteur de ce que tu m'as transmis. On a besoin de parents comme vous pour réussir à faire face, merci de m'avoir donné les armes qui m'ont permis et me permettront de surmonter les écueils de la vie. Merci ma petite sœur, toi que j'aurais choisi si on m'avait laissé le choix. Mon bouchon, merci tout simplement d'être ma sœur.

Les amis de ma vie, merci. Je ne vais citer personne, ni vanter vos qualités si je me lance, je ne pourrai plus m'arrêter de dire à quel point je suis riche de vous, de vos rires, de votre soutien, de nos grandes discussions, de nos projets, de nos rêves, mais aussi de toutes nos mauvaises idées !! Vous êtes bien plus que des amis.

C'est forte de vous tous (et de mon doctorat, je m'égare mais c'est quand même de ça qu'on parle) que j'ai incroyablement confiance en l'avenir.

En vrai, c'est aussi merci à la Vie.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Communications et publications

Publications :

Overexpression of both full-length and truncated isoforms of bovine PGC-1alpha enhances myoblasts differentiation.

Jessica Bamba, Alexis Parenté, Nathalie Duprat, Lionel Forestier, Véronique Blanquet
Gene Reports, 2018, doi : 10.1016/j.genrep.2018.10.012

Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats.

Nolwenn Joffin, Anne-Marie Jaubert, Jessica Bamba, Robert Barouki, Philippe Noirez, Claude Forest
Adipocyte, 2015 Jan 7 ; 4(2):129-34. doi : 10.4161/21623945.2014.989748. eCollection 2015 Apr-Jun.

Présentations orales :

Phenotypic variability of muscular development in Blonde d'Aquitaine cattle, Séminaire des thésards INRA, Toulouse, Mars 2016

Phenotypic variability of muscular development in Blonde d'Aquitaine cattle, Séminaire de l'Ecole Doctorale Bio Santé Pouligny-Notre-Dame, Février 2016

Posters :

Phenotypic variability of muscle development in Blonde d'Aquitaine cattle breed: Accurate analysis of a newly discovered allele of GDF-8 gene encoding myostatin

Jessica BAMBBA, Khaled BOUHOUC, Laetitia MAGNOL, Véronique BLANQUET, Ahmad OULMOUDEN,
Séminaire des thésards INRA, La Rochelle, Mai 2015

Structure/fonction study of the bovine PPARGC1A gene

Jessica Bamba, Véronique Blanquet

Journée GEIST, Limoges, Décembre 2017

Liste des abréviations

ALK	Activin-Like Kinase
4EBP1	eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-Binding Protein 1
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
CREB	C-AMP Response Element-Binding protein
C-ter	C-terminale
ERR	Estrogen-Related Receptor
EST	Expressed Sequences Tag
FoxO	Forkhead box
FXR	Farnesoid X Receptor
GR	glucocorticoid receptor
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
GWAS	Genome-Wide Association Study
HAT	Histone Acetyl Transferase
HFC	Host Cell Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HNF4a	Hepatocyte Nuclear Factor-4
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
LXR	Liver X Receptor
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCAD	Medium-Chain acyl-coenzyme A Dehydrogenase
MCK	Muscle Creatine Kinase
Med	Mediator complex subunit 1
MEF2C	Myocyte Enhancer Factor-2C
mh	muscular hypertrophy
MRF	Myogenic Regulatory Factor
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
MuRF-1	Muscle RING-finger protein-1
Myf5	Myogenic factor 5

MyHC	Myosin Heavy Chain
NLS	Nuclear Localisation Sequence
NRF	Nuclear Respiratory Factor
NRF	NF-κB-Repressing Factor
N-ter	N-terminale
Pax 3/7	Paired box 3/7
PERC (ou PGC-1b)	PGC-1 related Estrogen Receptor Coactivator
PGC-1α (ou PPARGC1A)	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator-1 α
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKA	Protéine Kinase A
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PRC	PGC-1 related coactivator
PRC	PGC-1 Related Coactivator
PXR	Pregnane X Receptor
QTL	Quantitative Trait Loci
RRM	RNA Recognition Motif
RXR	Retinoid X Receptor
S6K	S6 kinase
SDH	Succinate Dehydrogenase
Sirt 1	Sirtuine 1
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism
SR	Serine Arginine
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator-1
TFAm	Mitochondrial Transcription Factor A
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
TR	Thyroid hormone Receptor
UCP	Uncoupling Protein
VDR	Vitamin D Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
YY1	Yin Yang-1

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1. LA SUPERFAMILLE PGC-1	5
1.1. PGC-1 α : famille de transcrits.....	7
1.1.1 Structure du gène et transcrits alternatifs.....	7
1.1.2 Structure protéique et fonctions biologiques.....	9
1.2. PGC-1 β	15
1.3. PRC.....	17
2. TISSU MUSCULAIRE ET PGC-1 α	18
2.1. Tissu musculaire.....	18
2.1.1 Généralités.....	18
2.1.2 Régulation du développement musculaire, hypertrophie et atrophie.....	26
2.2. PGC-1 α dans le muscle squelettique.....	33
2.2.1 PGC-1 α et adaptation.....	36
2.2.2 PGC-1 α et typage de fibre.....	39
3. CARACTERISTIQUES DES BOVINS HYPERMUSCLES, IMPLICATION DE PGC-1 α ?	42
RESULTATS.....	47
DISCUSSION GENERALE.....	66
REFERENCES.....	73

Index des figures

Figure 1 : Membres de la super famille PGC-1.....	6
Figure 2 : Variants de PGC-1 α	8
Figure 3 : Schéma des domaines protéiques des formes longues et tronquées de PGC-1 α -a.....	9
Figure 4 : Localisation cytoplasmique de NT-PGC-1 α -a	11
Figure 5 : NT-PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -b (PGC-1 α 4) induisent préférentiellement un programme angiogénique.....	13
Figure 6 : PGC-1 α régule l'angiogenèse	14
Figure 7 : Les souris PGC-1 α ^{-/-} développent une stéatose hépatique lorsqu'elles sont soumises au jeûne.	15
Figure 8 : Coloration de l'enzyme SDH (succinate déshydrogénase) dans des sections de muscle <i>gastrocnemius</i>	17
Figure 9 : Organisation générale du muscle.....	19
Figure 10 : Représentation schématique d'un sarcomère	20
Figure 11 : Schéma décrivant les différences entre les métabolismes du glucose, du lactate et des acides gras des fibres musculaires à contraction rapide et lente	22
Figure 12 : Schéma illustrant les étapes de ma myogenèse chez le bovin.....	24
Figure 13 : Différentes étapes de la myogenèse en culture primaire de myoblastes bovins.....	24
Figure 14 : Implication des facteurs de transcription myogéniques dans la myogenèse	25
Figure 15 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation du développement musculaire.....	26
Figure 16 : Schéma de la voie de signalisation de la myostatine.	30
Figure 17 : Augmentation de la masse musculaire dans les membres supérieurs d'une souris myostatine ^{-/-}	30
Figure 18 : Cas d'hypertrophie musculaire chez l'homme.....	31
Figure 19 : Comparaison des lévriers Whippets présentant chacun des trois génotypes possibles	32
Figure 20 : Exons dérivants du promoteur proximal ou alternatif du gène PGC-1 α	33
Figure 21 : Schéma représentatif de l'activation de PGC-1 α et de son expression génique dérivant de promoteur proximal ou distal.....	34
Figure 22 : Mécanisme de la croissance musculaire et de l'inhibition de l'atrophie par l'activité musculaire.....	35
Figure 23 : Les myotubes primaires qui expriment NT-PGC-1 α -b (PGC-1 α 4) présentent une sur-expression de IGF-1 et une sous expression de la myostatine.....	36
Figure 24 : Expression des formes longues ou tronquées et dérivant du promoteur proximal ou distal de PGC-1 α chez l'homme.....	37
Figure 25 : Rôle central de PGC-1 α dans la régulation de la plasticité des cellules musculaires squelettiques.....	39
Figure 26 : Triple marquage immunohistochimique des isoformes des chaines lourdes de la myosine.....	40

Figure 27 : NT-PGC-1 α -a induit l'expression des MyHC I, IIa et réduit l'expression de MyHC IIb et IIx dans les cellules C2C12.	41
Figure 28 : Marquage immunohistochimique de muscle <i>gastrocnemius</i> de souris sauvage (WT) et de souris sur-exprimant NT-PGC-1 α -b de façon muscle spécifique (Myo-PGC-1 α 4).....	41
Figure 30 : Trois grandes races de vaches allaitantes	42
Figure 31 : Représentation schématique du gène bovin de la myostatine.....	43
Figure 32 : Taureaux Blond d'Aquitaine	45
Figure 33 : Structure du gène PGC-1 α bovin.	46
Figure 34 : Structure schématique du gène PGC-1 α chez le bovin	61
Figure 35 : Séquence nucléotidique de PGC-1 α d'une partie des exons 10 et 11.	62
Figure 36 : Boîtes à moustaches illustrant la variabilité de l'expression des différents exons des dix animaux Blonds d'Aquitaine testés.....	65
Figure 37 : Expression de Pax7 des C2C12 sur-exprimant pControl, mPGC-1 α 1, bPGC-1 α 1, bNT-PGC-1 α , bPGC-1 α 4 en fin de prolifération et à 96h de différenciation	66
Figure 38 : Profil d'expression des isoformes de PGC-1 α chez la souris selon deux études.....	69
Figure 39 : Les myotubes murins sur-exprimant PGC-1 α 4 montrent une hypertrophie.....	71

Index des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres lentes (I) et rapides (II).....	21
Tableau 2 : Tableaux récapitulatifs de l'expression des transcrits de PGC-1 α chez le bovin et dans les tissus chez la Limousine.....	63
Tableau 3 : Jeunes bovins Blonds d'Aquitaine testés dans cette étude.	63

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Depuis des siècles, les bovins de rente sont sélectionnés sur des caractéristiques de carcasse, des critères de croissance de ainsi que pour leur facilité d'élevage. La sélection d'animaux produisant une viande de qualité a été réalisée durant de nombreuses années par les éleveurs par simple observation de critères morphologiques. L'essor de la génétique et des études d'association entre la présence d'un allèle d'un gène et d'un caractère phénotypique d'intérêt ont permis la mise en place d'outils génétiques permettant la sélection des animaux intéressants à des stades précoces de leur développement. Si ces tests génétiques précoces sont coûteux, ils permettent aux éleveurs de faire des économies considérables sur l'élevage de leurs animaux.

La recherche de l'origine génétique de l'apparition de caractères d'intérêts est donc un enjeu capital en agronomie. Bien que de nombreuses études aient porté sur le contrôle génétique de la myogenèse, l'état actuel de la recherche n'explique pas toutes les interactions possibles entre les éléments qui affectent la fonction musculaire et le processus adaptatif du muscle squelettique classiquement décrit.

Dans ce contexte, mon travail de thèse au sein de l'équipe GAMAA « Génomique AniMale, Amélioration, Adaptation » animée par le Pr. V Blanquet s'est inscrit dans un projet global qui consiste à mieux comprendre l'étude du déterminisme génétique des caractéristiques musculaires chez le bovin. Si pendant longtemps les études ont recherché la mutation responsable de l'hypermuscularité de la race bovine Blonde d'Aquitaine dans les parties codantes de la myostatine, c'est dans notre laboratoire qu'a été mise en évidence la mutation perte de fonction en 2014. Cette mutation est localisée dans une partie intronique du gène de la myostatine (Bouyer *et al.*, 2014). Les animaux homozygotes pour cette mutation sont hypermusclés mais ne présentent pas le phénotype extrême retrouvé chez la race bovine Bleu Blanc Belge. De plus, parmi ces animaux hypermusclés, il existe une grande variabilité phénotypique intra-race (du plus musclé au moins musclé). Ceci sous-entend l'implication d'autres gènes dans la régulation de la masse musculaire chez le bovin. Ces arguments ont conduit notre équipe à s'intéresser à l'étude de PGC-1 α chez le bovin.

Les connaissances concernant le gène PGC-1 α bovin étant limitées comparé au gène humain et murin, l'objectif premier de mes travaux de thèse a été de réaliser une étude *in silico* à partir des bases de

données afin de mettre en évidence les différents transcrits potentiels exprimés chez le bovin. Ensuite mes objectifs ont été (1) de mettre en évidence expérimentalement les transcrits alternatifs de PGC-1 α exprimés chez le bovin, (2) d'étudier leur distribution et leur niveau d'expression musculaire et (3) d'analyser leur implication dans le développement musculaire en mettant en place un modèle d'étude *in vitro*. La multiplicité des isoformes résultant de PGC-1 α ainsi que leur implication dans la myogenèse font de PGC-1 α un gène d'intérêt pour l'étude de la variabilité phénotypique musculaire retrouvée dans différentes races domestiques.

L'exposé bibliographique de ce manuscrit se divise en trois grandes parties. La première partie présente la famille des PGC-1, et plus particulièrement le membre PGC-1 α associé à ses différents transcrits. La seconde partie détaille le développement du tissu musculaire squelettique en s'intéressant aux connaissances actuelles de l'implication de PGC-1 α dans ce processus chez l'homme et la souris. Enfin une troisième partie permet de s'interroger sur l'impact potentiel que pourrait avoir PGC-1 α dans le développement musculaire chez les bovins hypermusclés. Les résultats obtenus au cours de ma thèse sont présentés sous forme d'un article publié dans le journal *Gene Reports* associé à des résultats complémentaires. L'ensemble de la stratégie utilisée est ensuite replacée lors de la discussion générale.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

Exposé bibliographique

1. LA SUPER FAMILLE PGC-1

La famille PGC-1 (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ) Coactivator-1, PPARGC1A) est constituée de trois membres : PGC-1 α , PGC-1 β (ou PERC : PGC-1 Related Estrogen Receptor Coactivator) et PRC (PGC-1 Related Coactivator) (Figure 1). En 1998, le premier membre PGC-1 α a été découvert lors d'un crible visant à découvrir les interactions protéine-protéine de PPAR γ . PGC-1 α est alors décrit comme étant impliqué dans la thermogénèse adaptative réalisée par le tissu adipeux brun (Puigserver *et al.*, 1998a). PGC-1 β et PRC ont été découverts à partir de recherches de protéines possédant une homologie de séquence génomique et protéique avec PGC-1 α . Bien qu'étant codés par des gènes différents, la similitude de la séquence protéique des membres de la famille PGC-1 explique leur redondance de fonction physiologique. Les PGC-1 sont polyvalents et ont la capacité d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription différents, activant par conséquent de nombreux processus biologiques dans de multiples tissus. Ils sont impliqués notamment dans le métabolisme, la gestion des dépenses énergétiques, la biogénèse et la capacité respiratoire des mitochondries (Anderson *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2002a).

Les protéines de la famille PGC-1 ont entre autres, un motif LXXLL de reconnaissance protéine-protéine dans la région N-terminale (N-ter), un signal de localisation nucléaire et un motif de reconnaissance des ARNs en C-terminale (C-ter). Ce domaine LXXLL est impliqué dans l'interaction avec des facteurs de transcription comme le facteur SRC-1/p300 (Steroid Receptor Coactivator-1) (Wallberg *et al.*, 2003). PGC-1 α et PRC possèdent une séquence riche en sérine/arginine (SR) caractéristique des protéines impliquées dans la synthèse et l'épissage des ARNs (Figure 1).

La partie C-ter est très conservée entre les différents PGC-1 (45% de similarité). Elle contient les domaines RRM (RNA Recognition Motif : reconnaissance des ARNs) et les domaines SR (reconnaissance de l'ADN simple brin et des ARN) (Villena, 2015). Les membres de la famille des PGC-1 sont des coactivateurs puisqu'ils ne possèdent pas de domaines de liaison à l'ADN double-brin. Les coactivateurs sont des protéines qui se lient aux facteurs de transcription et amplifient leur activité transcriptionnelle (Kupr and Handschin, 2015).

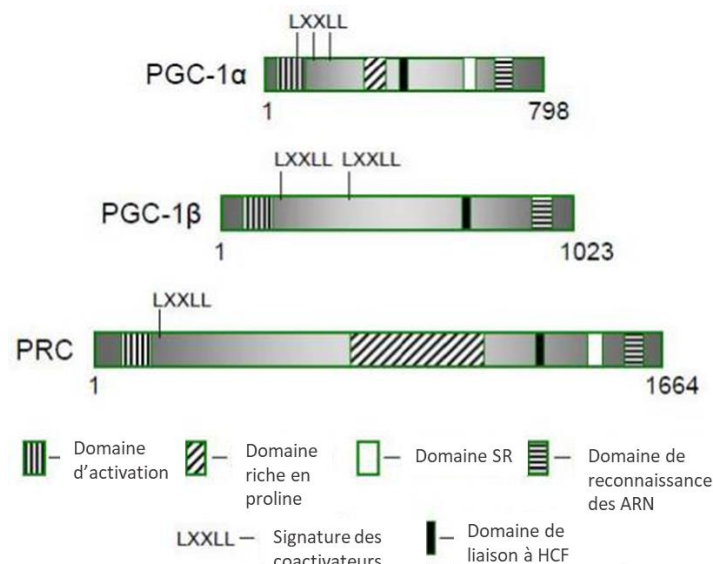


Figure 1 : Membres de la super famille PGC-1 α . Domaines protéiques schématisés de PGC-1 α , PGC-1 β et PRC. La longueur des isoformes est exprimée en acides aminés. *Domaine SR* : *Domaine riche en arginine et sérine*. *LXXLL* : *domaine riche en leucines*, signature des coactivateurs. *HCF* : *Host Cell Factor* (protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire). D'après Scarpulla, 2011.

L'augmentation de l'expression d'une protéine peut se faire grâce à une augmentation de sa synthèse ou par un ralentissement de sa dégradation. La modulation de l'expression des PGC-1 est le plus souvent causée par une augmentation de leur synthèse protéique, à la suite d'une exposition au froid par exemple. Physiologiquement, leur concentration est finement régulée et une dérégulation de leur concentration peut être délétère. Par exemple, une trop grande concentration de PGC-1 α dans le cœur pendant la vie intra-utérine entraîne une cardiomyopathie due à une toxicité causée par une prolifération aberrante des mitochondries (Russell *et al.*, 2004).

L'activation des PGC-1 entraîne une modification de l'expression des gènes cibles de façon tissu-spécifique. L'activité transcriptionnelle des PGC-1 est modulée grâce à des modifications post-traductionnelles qui influent leur capacité à recruter des complexes remodelant la chromatine. Les protéines PGC-1 sont importantes pour la régulation de certains phénomènes physiologiques dans le tissu adipeux brun, le foie, le cerveau, le cœur et le muscle squelettique (Correia *et al.*, 2015).

1.1. PGC-1 α : famille de transcrits

PGC-1 α est le membre le plus étudié de la famille PGC-1. Le gène PGC-1 α est contrôlé par plusieurs régions promotrices et soumis à un épissage alternatif qui donne naissance à des transcrits variants puis à différentes protéines. Ainsi, PGC-1 α intervient dans de nombreux processus biologiques.

1.1.1. Structure du gène et transcrits alternatifs

Chez la souris, le gène PGC-1 α est situé sur le chromosome 5 (brin anti sens : 51,454,250-51,567,726, Ensembl) et est composé de 13 exons (base de donnée Ensembl). Son expression est contrôlée par deux promoteurs, un promoteur proximal initialement identifié, et un promoteur distal situé 14 kb en amont du site d'initiation de la transcription (Chinsomboon *et al.*, 2009; Puigserver *et al.*, 1998a; Ruas *et al.*, 2012). Dans l'étude de Puigserver *et al.* (1998), l'ARN dont l'expression est contrôlée par le promoteur proximal et codant pour la protéine putative est nommée PGC-1 α . De nouvelles études ont permis de mettre en évidence l'existence d'ARNs alternatifs codés par ce même gène. Dès lors, l'ARNm putatif de 13 exons est appelé PGC-1 α 1 ou PGC-1 α -a, contenant l'exon 1a et codant la protéine de 797-aa. L'analyse des données des EST (Expressed Sequences Tag) a permis l'identification d'un promoteur alternatif du gène PGC-1 α . Les transcrits provenant de ce promoteur alternatif contiennent un nouvel premier exon nommé, selon les études, exon 1b ou exon 1' (Miura *et al.*, 2008; Ruas *et al.*, 2012). L'exon 1b peut coder pour 12-aa ou 3-aa (exon 1b' ou 1c) puisque la séquence comporte deux sites d'initiation de la transcription. Le transcrit contenant l'exon 1b à l'exon 13 est appelé PGC-1 α -b ou PGC-1 α 2 alors que le transcrit contenant l'exon 1b' à l'exon 13 est appelé PGC-1 α -c ou PGC-1 α 3 (Popov *et al.*, 2015)(Figure 2).

L'épissage alternatif en 3' des pré-ARN de PGC-1 α peut conduire après traduction à des protéines tronquées. L'intron 6 comporte un site accepteur d'épissage qui peut entraîner la rétention de 31 pb et introduire un codon stop prématuré. Ce nouvel exon 6 est appelé 6' ou 7a ; il contient l'exon 6 canonique additionné des 31 pb retenues (Ydfors *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009). Les formes tronquées de PGC-1 α sont alors nommées N-truncated PGC-1 α (NT-PGC1 α). Cette partie intronique est conservée entre les espèces (homme, souris, rat, chimpanzé, chien, chat, cheval ainsi que chez le bovin) (Zhang *et al.*, 2009)(Figure 2).

Les formes tronquées de PGC-1 α peuvent être contrôlées par le promoteur proximal ou le promoteur distal. Ainsi la forme tronquée peut être associée à l'exon 1a, il s'agit de NT-PGC1 α (NT-PGC-1 α -a) décrite par Zhang *et al.* (2009). La protéine tronquée résultante sera identique à la partie codée par les

exons 1a à 6 de PGC-1 α -a, soit les 267 premiers acides aminés, additionné de 4-aa comprenant le codon stop. La forme tronquée peut être également associée à l'exon 1b (isoforme appelée NT-PGC1 α -b ou PGC-1 α 4) ou à l'exon 1b'' (isoforme appelée NT-PGC1 α -c) (Figure 2). L'exposition au froid dans le tissu adipeux brun provoque un changement d'utilisation du promoteur au profit du promoteur distal. En effet PGC-1 α -b et -c mais aussi NT-PGC1 α -b et -c sont plus exprimés dans cette condition (Chang *et al.*, 2012)(Figure 2).

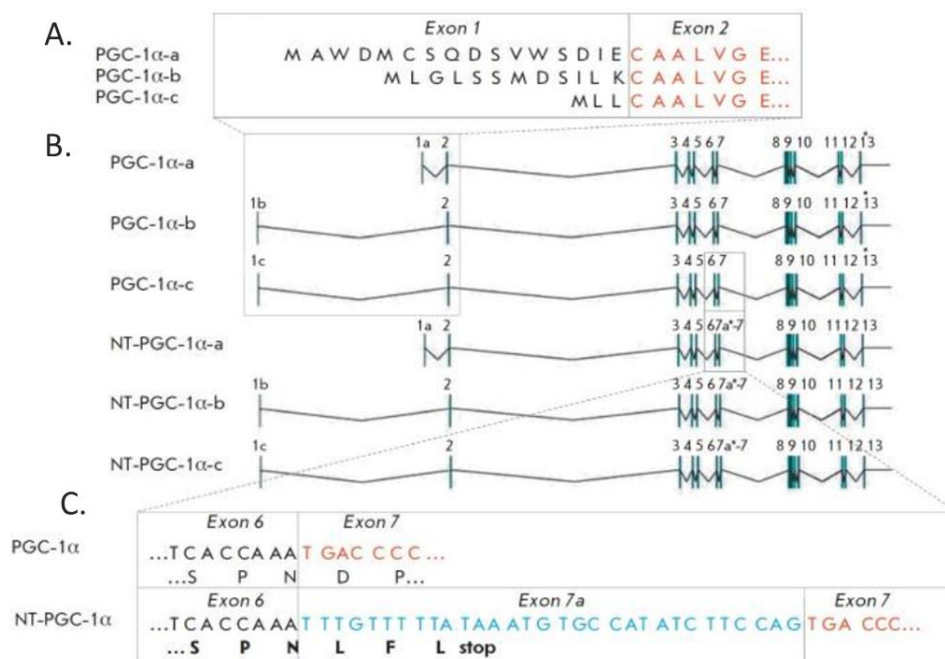


Figure 2 : Variants de PGC-1 α . Les ARNm de PGC-1 α sont contrôlés par le promoteur canonique (PGC-1 α -a) ou alternatif (PGC-1 α -b et PGC-1 α -c) chez la souris et soumis à un épissage alternatif. A, Séquence en acides aminés des protéines PGC-1 α -a, PGC-1 α -b et PGC-1 α -c, la séquence est conservée à partir de l'exon 2. B, Schéma des différents variants. La ligne horizontale correspond aux séquences non traduites, les traits verticaux correspondent aux exons. Les astérisques indiquent l'arrêt de la traduction des ARNm. C, Séquence nucléotidique de la partie intron 6 retenue lors de l'épissage alternatif. Popov *et al.*, 2015.

Chez l'homme, des transcrits spécifiques du foie ou du cerveau ont été décrits. Dans le foie, le site d'initiation de la transcription du futur ARNm L-PGC-1 α (L pour liver : foie) est localisé dans l'intron 2. Le codon d'initiation de la traduction est codé par l'exon 3. Ainsi, la protéine est tronquée des parties codées par les exons 1, 2 et une partie de l'exon 3 entraînant la perte de 127-aa et du premier motif LXXLL (Felder *et al.*, 2011). Le cerveau comporte plusieurs transcrits avec des exons spécifiques en région 5' nommés de B1 à B5 (B pour brain : cerveau). La séquence est la même à partir de l'exon 2 jusqu'à l'exon 13, excepté pour trois particularités, au niveau de l'intron 8, de l'intron 7 ou de l'exon 3. Les isoformes ont des longueurs variables et leur expression est contrôlée par un promoteur spécifique

du cerveau situé 587 kb en amont du promoteur proximal. Ces transcrits sont majoritaires dans le cerveau (Soyal *et al.*, 2012). Malgré la connaissance de ces isoformes spécifiques du foie et du cerveau, les différentes études ne mentionnent pas toujours les isoformes de PGC-1 α étudiés.

1.1.2. Structure protéique et fonctions biologiques

Structure protéique et activité transcriptionnelle

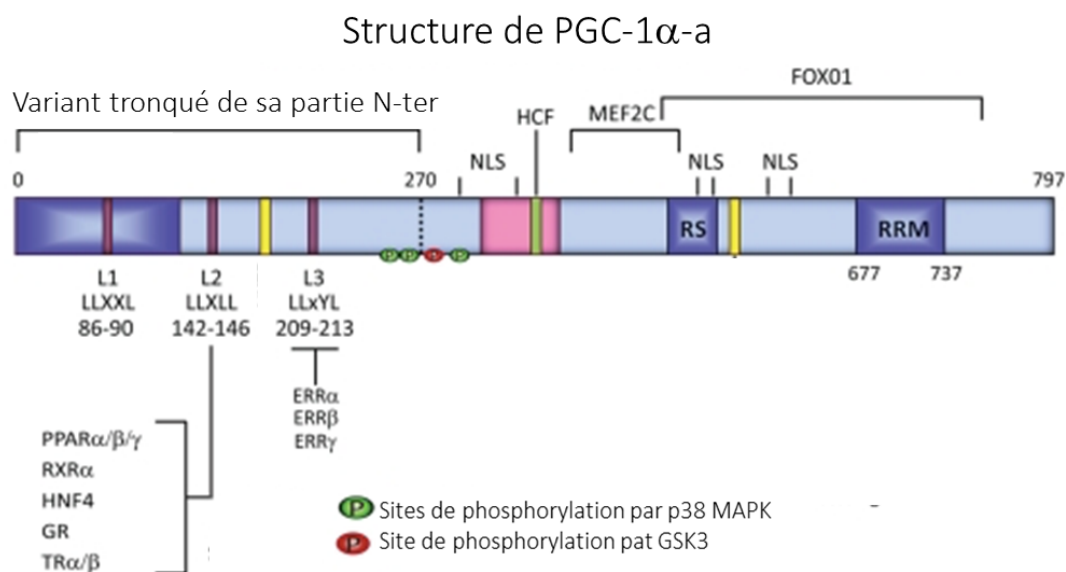


Figure 3 : Schéma des domaines protéiques des formes longues et tronquées de PGC-1 α -a. La longueur des variants et la position des domaines sont exprimées en acides aminés. Les séquences de SUMOylation sont indiquées en jaune. NLS : Nuclear Localisation Sequence. RS : domaine riche en arginine et sérine. RRM : RNA Recognition Motif. HCF : Host Cell Factor. MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C. MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases. GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3. Zhang *et al.*, 2009

La protéine PGC-1 α -a comporte deux domaines LXXLL (fragments 86-90 et 142-146) et un domaine LLxYL qui permettent la liaison aux facteurs de transcription. PGC-1 α -a comporte aussi deux séquences de SUMOylation, quatre sites de phosphorylation et des domaines d'adressage au noyau (Zhang *et al.*, 2009). Sa partie N-ter contient les éléments nécessaires à son activité transcriptionnelle en interagissant avec les complexes HAT (Histone Acetyl Transferase) (Figure 3).

Sa partie C-ter contient les domaines SR, permettant l'interaction avec l'ARN polymérase II, et le domaine de liaison à l'ARN (RRM) permettant de coupler la transcription à l'épissage des pré-ARN

(Monsalve *et al.*, 2000). La protéine PGC-1 α -a peut moduler l'état de la chromatine par l'assemblage des protéines modifiant les histones qui la remodelent. La protéine PGC-1 α -a peut déplacer les protéines répressives comme les histones désacétylases des promoteurs des gènes cibles et ainsi amorcer leur transcription.

Les isoformes de PGC-1 α sont cependant incapables de se fixer à l'ADN, ils agissent donc par l'intermédiaire de facteurs de transcription et de récepteurs nucléaires.

La protéine PGC-1 α -a est capable d'activer la transcription de nombreux récepteurs nucléaires comme les ERR (Estrogen-Related Receptor), les PPAR, les RXR (Retinoid X Receptor), les LXR (Liver X Receptor), les PXR (Pregnane X Receptor), les VDR (Vitamin D Receptor), ou aux TR (Thyroid hormone Receptor). Elle contient des domaines de liaison à d'autres facteurs de transcription comme MEF-2C (Myocyte Enhancer Factor-2C), FoxO1 (Forkhead box O1) or YY1 (Yin Yang-1) (Cunningham *et al.*, 2007; Puigserver *et al.*, 1998a, 2003) ou encore MED1 (Mediator complex subunit 1) (Wallberg *et al.*, 2003).

PGC-1 α -a est aussi capable d'activer de nombreux gènes nucléaires mitochondriaux via la liaison aux NRF-1 et -2 (Nuclear Respiratory Factor). Les NRF régulent l'expression des gènes nécessaires à la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ils sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes nucléaires et mitochondriaux en se liant au promoteur de TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A). PGC-1 α -a est donc impliqué dans la biogénèse mitochondriale et dans la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial notamment via TFAM (Riehle and Abel, 2012).

Les protéines tronquées en C-ter contiennent les domaines de liaison à SRC-1 et CREB (C-AMP Response Element-binding protein), deux motifs LXXLL et deux sites de phosphorylation mais ne contiennent pas les domaines RS/RRM ainsi que les domaines d'adressage au noyau (Puigserver *et al.*, 1998a). Les domaines RS et RRM en C-ter ne sont pas indispensables à l'activation des gènes cibles. En effet, ils ne sont pas présents dans les variants tronqués de PGC-1 α qui gardent cependant leur fonction de coactivateurs (Chang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009) (Figure 3).

La localisation cellulaire des PGC-1 α est un moyen supplémentaire de réguler leur activité. En effet, ne possédant pas de signal NLS (Nuclear Localisation Sequence), NT-PGC-1 α -a est majoritairement localisé dans le cytoplasme (Figure 4). Les protéines tronquées ont bien une fonction coactivatrice mais se retrouvent accumulées dans le cytosol en condition basale. Cependant, leur faible poids moléculaire (inférieur à 50kDa) leur permet de diffuser à travers les pores nucléaires. De manière intéressante, NT-PGC-1 α -a contient en position N-ter un site riche en leucines qui fixe CRM1 (ou exportine 1 ; protéine

d'export nucléaire des protéines). Une fois fixé à CMR1, la protéine NT-PGC-1 α -a est transportée hors du noyau à un niveau qui supplante son niveau de diffusion dans le noyau. Ceci peut réguler négativement l'activité de NT-PGC-1 α -a en l'empêchant de former des complexes d'activation de la transcription. La phosphorylation de NT-PGC1 α -a par la PKA (Protéine Kinase A) réduit la capacité de CMR1 à l'exporter hors du noyau induisant une augmentation de sa concentration dans le noyau (Chang *et al.*, 2010). De plus, dans les adipocytes bruns, ce n'est qu'après activation par un analogue de l'AMP cyclique, que NT-PGC-1 α -a se retrouve dans le noyau où elle peut agir comme coactivateur (Zhang *et al.*, 2009).

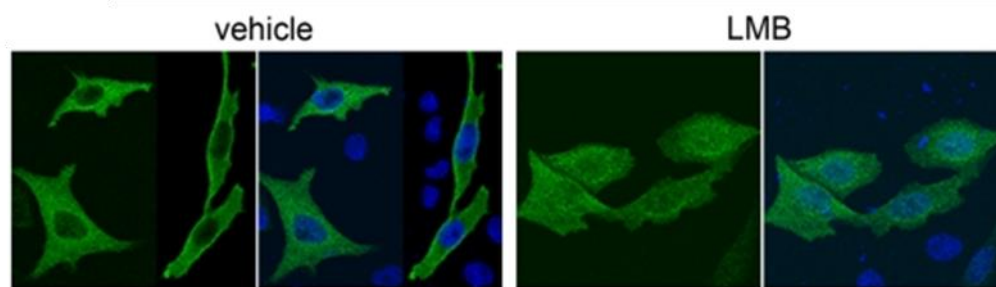


Figure 4 : Localisation cytoplasmique de NT-PGC-1 α -a. Sa localisation est sensible au LMB (leptomycin B, inhibiteur spécifique de CRM1) dans des cellules CHO-K1. Chang *et al.*, 2010.

La spécificité des interactions avec les facteurs de transcription est possible grâce aux modifications post-traductionnelles. PGC-1 α -a peut être phosphorylée par AMP-activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK, AKT, S6K (S6 Kinase) et GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) ; elle peut aussi être méthylée par GCN5 et désacétylée par Sirt1 (Sirtuine 1) (Fan *et al.*, 2004; Jäger *et al.*, 2007; Lerin *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Lustig *et al.*, 2011; Olson *et al.*, 2008; Rodgers *et al.*, 2005). La phosphorylation par p38 MAPK entraîne une augmentation de sa stabilité, de son activité transcriptionnelle ainsi qu'une augmentation de son accumulation dans le noyau (Puigserver *et al.*, 2001). Certaines protéines sont capables à l'inverse d'inhiber l'activité de PGC-1 α -a comme p160^{MBP} en empêchant sa phosphorylation par p38/MAPK (Fan *et al.*, 2004). La protéine PGC-1 α -a est dégradée via le système ubiquitin-protéasome qui est dépendant de la partie C-ter. Trausch-Azar *et al.* ont montré en 2010 que les mutants tronqués de leur partie C-ter étaient également ubiquitinylés et dégradés par le protéasome en 30 minutes. Ceci contredit une précédente étude de Sano *et al.* (2007) qui affirme que les mutants tronqués de PGC-1 α sont plus stables.

Les mécanismes de surveillance des ARNm (NMD, Nonsense-Mediated RNA Decay) permettent la dégradation des ARNm contenant des codons stop prématurés. Ce mécanisme protège la cellule des versions tronquées des protéines pouvant agir comme des dominants-négatifs ou positifs (Chang *et al.*,

2007). NT-PGC-1 α -a échappe au système de surveillance puisque les protéines sont détectées à des niveaux comparables à ceux de PGC-1 α -a. En fonction du tissu et des conditions biologiques, l'isoforme NT-PGC-1 α -a peut même être la forme la plus exprimée.

Fonctions biologiques

La concentration cellulaire de PGC-1 α -a est finement régulée par le contrôle de la balance synthèse/dégradation protéique en fonction des besoins énergétiques et de la disponibilité des substrats. De plus, l'expression de PGC-1 α -a est régulée en fonction du contexte physiologique et de façon tissu-spécifique (Finck and Kelly, 2006). L'étude de Puigserver *et al.*, (1998) montre que PGC-1 α -a est exprimée dans les tissus adipeux blanc et brun, le muscle squelettique, le cœur, le rein, le foie et le cerveau.

- **PGC-1 α et thermogénèse**

Le tissu adipeux brun est l'organe majeur de la thermogénèse adaptative en cas d'exposition au froid. En effet, il permet via l'expression d'UCP-1 (Uncoupling Protein-1) de découpler la chaîne respiratoire et de provoquer une fuite de protons pour produire de la chaleur au détriment de la production d'ATP à partir de substrats énergétiques. Le muscle squelettique est aussi capable de thermogénèse. PGC-1 α -a, à travers PPAR γ , régule l'expression des UCP. Lorsque PGC-1 α -a est sur-exprimé de 6%, les adipocytes blancs doublent leur taux de mitochondries et augmentent l'expression de UCP-1, leur faisant adopter le même profil que les adipocytes bruns.

Dans le muscle squelettique PGC-1 α -a est induit après 12h d'exposition au froid. Cependant, dans le rein et le cœur l'expression de PGC-1 α -a ne répond pas à l'exposition au froid (Puigserver *et al.*, 1998b).

- **PGC-1 α et homéostasie glucidique**

Chez l'adulte, l'expression de PGC-1 α -a est augmentée dans le foie en cas de jeûne. La transition de l'état nourri au jeûne implique des changements métaboliques importants afin que l'organisme s'adapte à la privation : l'activation de la néoglucogénèse, l'oxydation des acides gras, la synthèse et la sécrétion des corps cétoniques. PGC-1 α -a est capable d'activer les gènes nécessaires à la réponse hépatique au jeûne : HNF4 α (Hepatocyte Nuclear Factor-4), PPAR α , GR (Glucocorticoid Receptor), FOXO1, FXR (Farnesoid X Receptor), LXR (Lin *et al.*, 2005). L'induction de PGC-1 α -a par le jeûne mène à une augmentation de l'expression des gènes de la néoglucogénèse pour le maintien de l'homéostasie glucidique par la production de glucose hépatique (Yoon *et al.*, 2001).

- **PGC-1 α , fonction cardiaque et musculaire**

La protéine PGC-1 α étant impliquée dans la biogénèse mitochondriale, elle est physiologiquement fortement exprimée dans le cœur, un muscle qui demande constamment un haut niveau d'énergie. En effet, les réserves en ATP ne sont pas suffisantes pour le faire fonctionner au-delà de 10 secondes (Lin *et al.*, 2002b). En revanche, chez la souris, la sur-expression de PGC-1 α induit une biogénèse mitochondriale incontrôlée qui provoque une perte des structures sarcomériques et une cardiomyopathie dilatée (dilatation des ventricules et augmentation de la taille des cavités cardiaques) (Lehman *et al.*, 2000). Cette cardiomyopathie peut être « inversée » lorsque la sur-expression de PGC-1 α est éteinte (Russell *et al.*, 2004).

Dans le muscle cardiaque et squelettique, PGC-1 α est un régulateur important du métabolisme oxydatif (Rowe *et al.*, 2010). Dans le muscle squelettique, PGC-1 α est induit par l'exercice, la stimulation nerveuse et l'hypoxie (Shoag and Arany, 2010). Chez la souris, PGC-1 α peut être retrouvée dans les mitochondries des muscles squelettiques en interaction avec TFAM ou Sirt1. PGC-1 α peut donc directement réguler la transcription des gènes mitochondriaux (Aquilano *et al.*, 2010; Safdar *et al.*, 2011). Dans le muscle squelettique, les formes tronquées de PGC-1 α induisent un programme angiogénique plutôt qu'un programme mitochondrial. En effet, les formes tronquées ne possèdent pas la séquence protéique liant les NRF-1 et 2 responsables du programme mitochondrial (Thom *et al.*, 2014) (Figure 5).

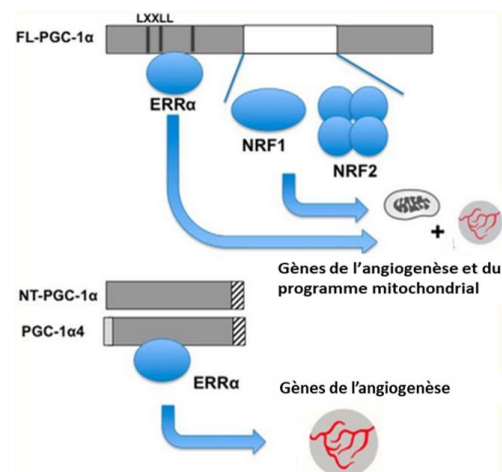


Figure 5 : NT-PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -b (PGC-1 α 4) induisent préférentiellement un programme angiogénique. FL-PGC-1 α se lie à ERR α et aux NRF, permettant l'induction des gènes mitochondriaux et angiogéniques. NT-PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -b ne se lient qu'à ERR α , ce qui permet uniquement l'induction des gènes du programme angiogénique, tel que VEGF. *ERR* : Estrogen-Related Receptor ; *NRF* : Nuclear Respiratory Factor ; *VEGF* : Vascular Endothelial Growth Factor. Thom *et al.*, 2014.

- **PGC-1 α et angiogénèse**

En cas d'hypoxie, la protéine PGC-1 α -a est activée et en réponse, induit un programme angiogénique en régulant VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) *in vitro* et *in vivo*. L'expression de VEGF *in vivo* provoque une néovascularisation. PGC-1 α -a est capable d'activer VEGF de façon indépendante de HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1 ; membre majeur de la voie canonique de réponse à l'hypoxie) en passant par la voie ERR α (Arany *et al.*, 2008)(Figure 6).

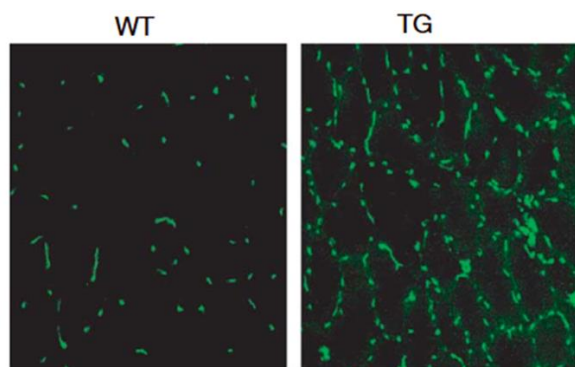
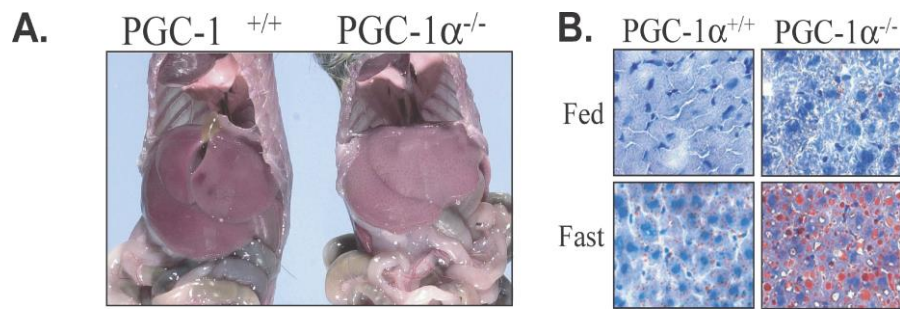


Figure 6 : PGC-1 α régule l'angiogénèse. Immunomarquage de CD31 (marqueur des cellules endothéliales) sur des sections de muscle *Tibialis anterior*. Le panneau de gauche montre une section de muscle de souris sauvage. Le panneau de droite montre une section de muscle de souris transgénique sur-exprimant PGC-1 α . Arany *et al.*, 2008.

- **Les souris PGC-1 α -a^{-/-}**

Chez la souris, l'extinction de PGC-1 α -a entraîne la perturbation de nombreuses voies de signalisation causant des dommages dans plusieurs organes, comme le foie, le tissu adipeux brun, le cerveau et les muscles cardiaques et squelettiques. Les souris PGC-1 α -a^{-/-} ubiquitaire ou spécifique du foie développent une hypoglycémie et une stéatose hépatique (Figure 7). Elles sont sensibles au froid avec une faible expression d'UCP-1 (Lin *et al.*, 2004). Leur tissu adipeux brun est morphologiquement anormal, il présente une accumulation de grosses gouttelettes lipidiques typique du tissu adipeux blanc. Les souris PGC-1 α -a^{-/-} montrent également des désordres neurologiques, en effet, elles présentent une hyperactivité associée à une neurodégénération (Leone *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2004).



- **Autres implications de PGC-1α-a**

Il a été démontré un lien entre un dysfonctionnement de la fonction de PGC-1α-a et la maladie de Huntington. La sur-expression de PGC-1α-a entraîne une altération de la fonction dopaminergique qui joue un rôle important dans le contrôle des mouvements coordonnés (Soyal *et al.*, 2012). L'activation de PGC-1α-a dans le muscle protège le cerveau de la dépression induite par le stress. Les souris transgéniques sur-exprimant PGC-1α-a sont résistantes au stress et protégées des changements pro-inflammatoires pouvant déclencher un syndrome dépressif (Agudelo *et al.*, 2014).

De nombreuses études ont montré l'implication de PGC-1α-a dans le processus de tumorigénèse. Son rôle, oncogène ou anti-oncogène, est cependant incertain. Son expression dépend du type et du tissu dans lequel est localisée la tumeur (Gravel, 2018; Yun *et al.*, 2018).

1.2. PGC-1β

Chez la souris, le gène PGC-1β est localisé sur le chromosome 18 (brin anti sens : 64,845,650-64,965,860) et est composé de 13 exons. Chez l'homme, la protéine PGC-1β est codée par un gène de 78 kb et de 13 exons localisé sur le chromosome 5. Il a été décrit différents isoformes humains issus de la transcription du gène PGC-1β. Ces isoformes peuvent différer par leur extrémité C-ter (PGC1β-a et PGC-1β-b) ou par leur extrémité N-ter (PGC1β-1 et PGC-1β-2). PGC1β-1a est la forme la plus abondante et interagit avec TR, PPARα et PPARγ. Les protéines PGC-1β ne possèdent pas de domaine RS associé à la maturation des ARN (Meirhaeghe *et al.*, 2003).

La protéine PGC-1β, comme PGC-1α, est localisée dans le noyau et est exprimée dans des tissus contenant beaucoup de mitochondries comme le tissu adipeux brun, le cœur et le muscle squelettique

(Lin *et al.*, 2002a). Son expression n'est pas augmentée après une exposition au froid ou à un régime riche en lipides contrairement à PGC-1 α (Meirhaeghe *et al.*, 2003). La protéine PGC-1 β a initialement été décrite pour avoir un rôle dans la néoglucogenèse hépatique mais son incapacité à lier HFN4 α et FoxO1 remet en cause son implication dans l'induction des gènes de la néoglucogenèse dans le foie et les lignées cellulaires hépatiques (Lin *et al.*, 2002a, 2003). PGC-1 β interagit avec NRF-1 tout comme PGC-1 α et est impliquée dans l'expression des gènes nucléaires de la chaîne respiratoire et de la biogénèse mitochondriale (Lin *et al.*, 2003).

Dans le but de démontrer les effets complémentaires de PGC-1 α et 1 β , l'inhibition de PGC-1 β dans des pré-adipocytes bruns PGC-1 α ^{-/-} a été réalisée. Ces cellules présentent une diminution de l'induction de l'expression d'UCP-1 et d'ERR α pendant la différenciation des pré-adipocytes. Ce modèle permet de démontrer que ni PGC-1 α ni PGC-1 β ne sont nécessaires pour la différenciation des adipocytes mais qu'il faut qu'au moins un des deux soit exprimé pour l'acquisition du phénotype adipocytaire brun, en maintenant l'expression des gènes mitochondriaux ainsi que la densité et la respiration des mitochondries (Uldry *et al.*, 2006). PGC-1 β ne peut cependant pas compenser tous les effets d'une inhibition de PGC-1 α . En effet, comme vu précédemment, le KO de PGC-1 α entraîne un phénotype bien particulier (Leone *et al.*, 2005).

Les souris PGC-1 β ^{-/-} montrent un défaut de la fonction mitochondriale en condition de stress. Dans les tissus adipeux, l'inhibition de PGC-1 β est compensée par une sur-expression de PGC-1 α . En revanche, cette inhibition n'est pas compensée dans le foie, le cœur ou le muscle squelettique. Dans le muscle squelettique et dans le cœur, le nombre de mitochondries par fibre est moins important chez les souris PGC-1 β ^{-/-} que chez les souris sauvages, le muscle produit donc moins d'énergie. Cependant, le cœur des souris PGC-1 β ^{-/-} présente une fonction contractile normale en condition basale (Sonoda *et al.*, 2007). Quand elles sont soumises à un régime riche en lipides, les souris KO présentent une accumulation de lipides dans le foie associée à une stéatose (Lelliott *et al.*, 2006). Les souris PGC-1 β ^{-/-} développées dans l'étude de Sonoda *et al.* (2007) ne s'adaptent pas à l'exposition au froid contrairement aux souris de l'étude de Lelliott *et al.* (2006). L'étude confirme cependant les résultats obtenus sur le foie. Contrairement aux souris PGC-1 α ^{-/-} qui montrent une hyperactivité, les souris PGC-1 β ^{-/-} ont une activité diminuée durant le cycle nocturne. PGC-1 β semble donc nécessaire pour une régulation normale de l'activité motrice en fonction du cycle circadien (Sonoda *et al.*, 2007).

Les souris transgéniques sur-exprimant le gène PGC-1 β ont une dépense énergétique accrue, elles sont plus minces malgré leur hyperphagie. PGC-1 β en se liant à ERR α entraîne la sur-expression de MCAD (Medium-Chain acyl-coenzyme A dehydrogenase) qui permet l'augmentation de l'oxydation des acides gras (Kamei *et al.*, 2003; Sladek and Bader, 1997)

PGC-1 α et β double KO :

PGC-1 β partage environ 50% d'identité avec les 180 premiers acides aminés de PGC-1 α et partage 50% d'homologie avec la partie C-ter de PGC-1 α . PGC-1 α et -1 β ont des rôles complémentaires. PGC-1 α et -1 β ont des effets différents sur les mitochondries.

Le double KO PGC-1 α et -1 β entraîne la létalité des souris peu après la naissance. Les souris naissent avec de plus petits cœurs présentant de graves troubles de la conduction atrio-ventriculaire. Les mitochondries immatures des cardiomyocytes sont incapables de générer suffisamment d'ATP pour leur fonctionnement (Lai *et al.*, 2008).

Dans le muscle squelettique, les souris PGC-1 α / β ^{-/-} ont une activité mitochondriale diminuée (Zechner *et al.*, 2010)(Figure 8).

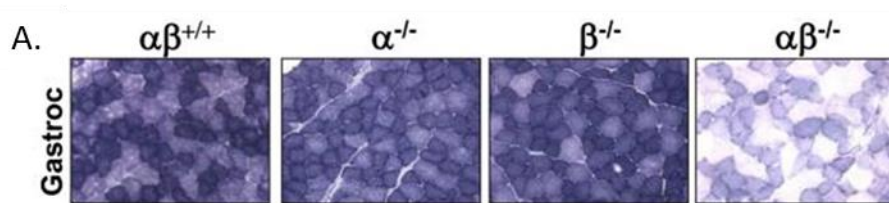


Figure 8 : Coloration de l'enzyme SDH (succinate déhydrogénase) dans des sections de muscle *gastrocnemius*. Les souris PGC-1 α / β ^{-/-} ont une activité mitochondriale diminuée. L'activité de la SDH reflète l'activité mitochondriale. Zechner *et al.*, 2010.

1.3. PRC

Chez la souris, le gène PRC est localisé sur le chromosome 19 (brin sens : 46,044,886-46,072,915) et composé de 14 exons. PRC est une protéine de 177-kDa liée à la famille des PGC-1. Elle possède des structures protéiques communes avec PGC-1 α et PGC-1 β (Figure 1). PRC est une protéine nucléaire contenant un motif de reconnaissance des ARN, un domaine RS en C-ter, un domaine d'activation de la transcription en N-ter et une région riche en proline en position centrale. Comme les PGC-1, la protéine PRC contient un motif LXXLL suggérant qu'elle répond aux signaux hormonaux. En effet, PRC est capable de lier le récepteur à l'estrogène et le récepteur de l'hormone thyroïdienne à ses parties N et C-ter (Andersson and Scarpulla, 2001).

Bien qu'elle fixe et active NRF-1, l'expression de PRC ne semble pas induite par l'exposition au froid dans le tissu adipeux brun contrairement à PGC-1 α . En effet, PRC est exprimé de façon similaire dans les tissus adultes et embryonnaires chez la souris, montrant un potentiel rôle de gène de ménage.

L'expression de PRC est élevée dans les cellules en prolifération. En effet, PRC favorise la prolifération cellulaire et elle est induit par les facteurs de croissance présents dans le sérum (Gleyzer and Scarpulla, 2011). PRC forme un complexe avec NRF-2 et HCF-1 (Host Cell Factor C1, essentielle dans la progression du cycle cellulaire). Le KO de PRC dans les cellules en prolifération entraîne une réduction de l'expression des gènes mitochondriaux conduisant à une diminution de la capacité de production

d'énergie. La diminution de l'efficacité de la chaîne respiratoire est expliquée par la prolifération de mitochondries déficientes. De plus, PRC est essentiel à la progression de la phase G₁ à la phase S du cycle cellulaire (Vercauteren *et al.*, 2008).

Le rôle essentiel de PRC dans la biogenèse mitochondriale et dans la progression du cycle cellulaire explique la létalité au stade embryonnaire des souris PRC^{-/-} (He *et al.*, 2012). L'expression de PRC est soumise à des régulations post-transcriptionnelles ou traductionnelles afin que sa concentration soit stable et n'entraîne pas d'effets délétères. De plus, PRC est dégradée par le protéasome et a une demi-vie très courte (Andersson and Scarpulla, 2001).

Dans les myoblastes C2C12, la sur-expression de PRC entraîne une altération myogénique et métabolique. La sur-expression de PRC entraîne une augmentation de l'absorption de glucose, basale ou stimulée par l'insuline ainsi qu'une activité mitochondriale accrue. PRC régule la myogénèse, en effet, son expression entraîne une augmentation de la prolifération et une augmentation de l'expression de MyoD et de la chaîne lourde de la myosine dans les C2C12 (Philp *et al.*, 2011). Chez l'homme, l'exercice d'endurance augmente l'expression de PRC. PRC a donc probablement un rôle dans l'adaptation du métabolisme du glucose et des acides gras nécessaire à l'exercice (Philp *et al.*, 2011).

2. PGC-1 α ET TISSU MUSCULAIRE

2.1. Tissu musculaire

2.1.1. Généralités

Le muscle squelettique représente environ 40% de la masse corporelle totale. C'est un tissu contractile, excitable et plastique. Ses fonctions sont diverses comme le maintien de la posture, la production de chaleur ou encore la production de mouvements volontaires. Pour assurer sa fonction, le tissu musculaire est richement innervé par des motoneurones et des neurones sensitifs et vascularisé.

Le tissu musculaire squelettique est composé de cellules musculaires striées, aussi appelées fibres musculaires. Ce sont les seules cellules de l'organisme à être plurinucléées, elles sont cylindriques et organisées de façon parallèle. Les cellules musculaires sont rattachées aux os par les tendons et peuvent atteindre 60 cm chez le bovin.

Le sarcoplasme (cytoplasme de la cellule musculaire) contient des organites essentiels à son activité comme les noyaux, les mitochondries et les réticulums sarcoplasmiques ainsi que des protéines myofibrillaires impliquées dans la contraction musculaire et de la myoglobine responsable du stockage de l'oxygène. Le sarcoplasme contient aussi des molécules nécessaires au métabolisme énergétique comme le glycogène et l'ATP. Au sein du muscle sont également présents des triglycérides et des

phospholipides. Ces lipides sont stockés dans le tissu adipeux inter musculaire ou au sein même de la cellule musculaire. Par exemple, la présence de ces lipides est importante pour les propriétés organoleptiques de la viande.

La fibre musculaire

Les fibres musculaires ou myocytes sont responsables de la contraction. Chaque fibre est entourée par une enveloppe appelée endomysium et contient environ 100 noyaux provenant de la fusion des myoblastes (cellules précurseurs). Elles s'associent ensuite en faisceaux contenant 20 à 80 fibres musculaires entourés par une enveloppe de tissu conjonctif appelé périmysium. L'ensemble du tissu musculaire est recouvert d'une trame conjonctive externe, l'épimysium (Figure 9).

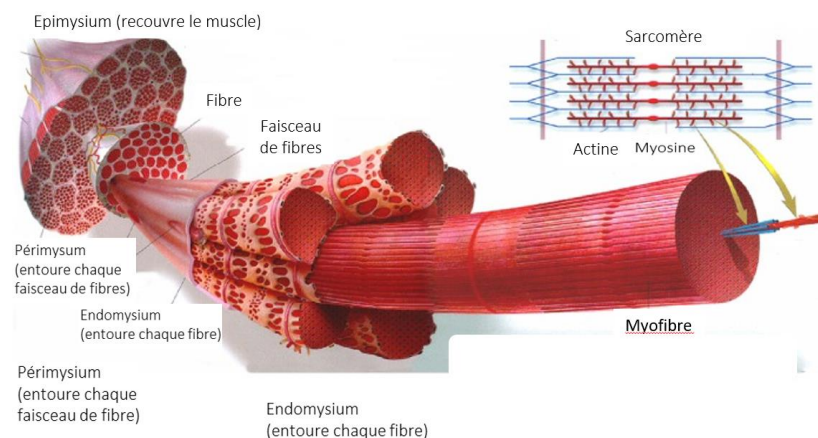


Figure 9 : Organisation générale du muscle. L'endomysium entoure chaque fibre musculaire, le périmysium compartimente les fibres en faisceaux et l'épimysium est l'enveloppe externe du muscle. Image téléchargée à partir de Pour La Science n°276 Octobre 2000.

La membrane plasmique des cellules musculaires est appelée sarcolemme et son cytoplasme le sarcoplasme. Le sarcoplasme contient les myofibrilles, représentant 80% du volume intracellulaire. Chaque myofibrille est constituée d'une répétition de sarcomères comprise entre deux stries Z successives. Un sarcomère, l'unité structurale de la myofibrille, représente l'alternance de filaments fins constitués d'actine, de troponine et de tropomyosine et de filaments épais constitués de myosine. Les bandes I, aux extrémités des sarcomères, sont composées de filaments fins tandis que les bandes A correspondent à la zone où les filaments fins et épais se chevauchent. Au centre d'une bande A se trouve la ligne M, correspondant à un épaississement des filaments de myosine (Figure 10).

L'alternance de filaments fins et épais et le glissement les uns sur les autres permet la contraction musculaire (Huxley *et al.*, 1985 ; Sanger *et al.*, 2010).

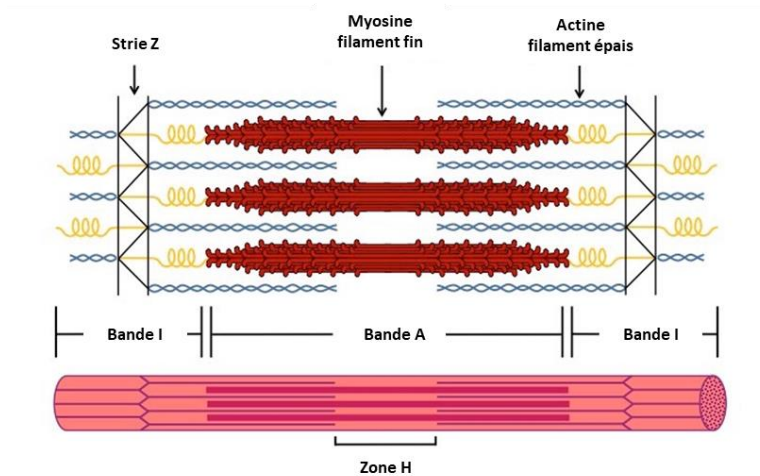


Figure 10 : Représentation schématique d'un sarcomère. Le sarcomère contient des filaments fins d'actine et des filaments épais de myosine. Les stries Z délimitent les sarcomères et sont le point d'ancrage des filaments d'actine. Les filaments de myosine sont situés au centre du sarcomère. La zone H est constituée de filaments de myosine.

Les différents types de fibres

Chez les mammifères, la plupart des muscles contiennent différents types de fibres. Les différents types de fibres sont classés en fonction de l'expression des isoformes de la myosine. La myosine est une protéine dimérique comprenant deux chaînes longues identiques, les chaînes lourdes (Myosine Heavy Chain, MyHC), auxquelles sont associées quatre chaînes plus courtes, les chaînes légères (Myosine Light Chain, MyLC). Le poids moléculaire des MyHC est de 200kDa contre 16-18kDa pour les MyLC. La myosine porte l'activité ATPasique produisant l'énergie nécessaire à la contraction musculaire. Plusieurs types de fibres ont été décrits en fonction de leur capacité à produire de l'énergie et de la rapidité de leur contraction. Elles expriment alors différents isoformes de MyHC :

- la myosine embryonnaire (E)
- la myosine foétale (F)
- la myosine α -cardiaque (Molkentin *et al.*, 1996)
- la myosine à contraction lente et à activité oxydative (MyHC de type I)
- et deux types de myosine à contraction rapide :
 - à activité oxydative (MyHC de type IIa)
 - à activité glycolytique (MyHC de type IIb)
- la myosine de type IIx exprimant des caractéristiques intermédiaires entre la myosine de type IIa et IIb

Type de fibre	I	IIA	IIX	IIB
Contraction	Lente	Rapide	Rapide	Rapide
MyHC	I	Ila	Ilx	Ilb
Métabolisme	Oxydatif	Oxydo-glycolytique	Oxydo-glycolytique	Glycolytique
Résistance à la fatigue	+++	++	+	+
Nombre de mitochondries	+++	++	+	+
Activité ATPasique	Faible	Forte	Forte	Forte

Tableau 1 : Caractéristiques des fibres lentes (I) et rapides (II). D'après Brooke and Kaiser, 1970.

Les fibres exprimant majoritairement l'isoforme MyHC I sont les fibres de type I alors que les fibres exprimant majoritairement l'isoforme MyHC Ila, Ilx, Ilb sont les fibres de type IIA, IIX et IIB respectivement (Tableau 1). Les fibres de type I utilisent la phosphorylation oxydative comme source d'énergie, elles contiennent beaucoup de mitochondries. Ce sont des fibres à contraction lente et peu fatigables. Elles sont présentes notamment au niveau des muscles de la posture et du muscle cardiaque. Les fibres de type IIA ont un métabolisme surtout oxydatif. Elles possèdent une fatigabilité et une vitesse de contraction intermédiaire. Les fibres de type IIB ont un métabolisme glycolytique, elles contiennent moins de mitochondries que les fibres de type I. Elles sont rapidement fatigables, mais possèdent une vitesse de contraction rapide. Elles sont présentes dans les muscles sollicités lors d'exercices physiques plus intenses et de courte durée (Schiaffino and Reggiani, 2011). Les fibres de type IIX sont des fibres à contraction rapide et à métabolisme oxydo-glycolytique, intermédiaire entre les fibres IIA et IIB (Figure 11). Les fibres peuvent aussi être hybrides, c'est-à-dire qu'elles peuvent renfermer plusieurs types de myosine, par exemple, les fibres IIC renferment les isoformes de MyHC I et Ila.

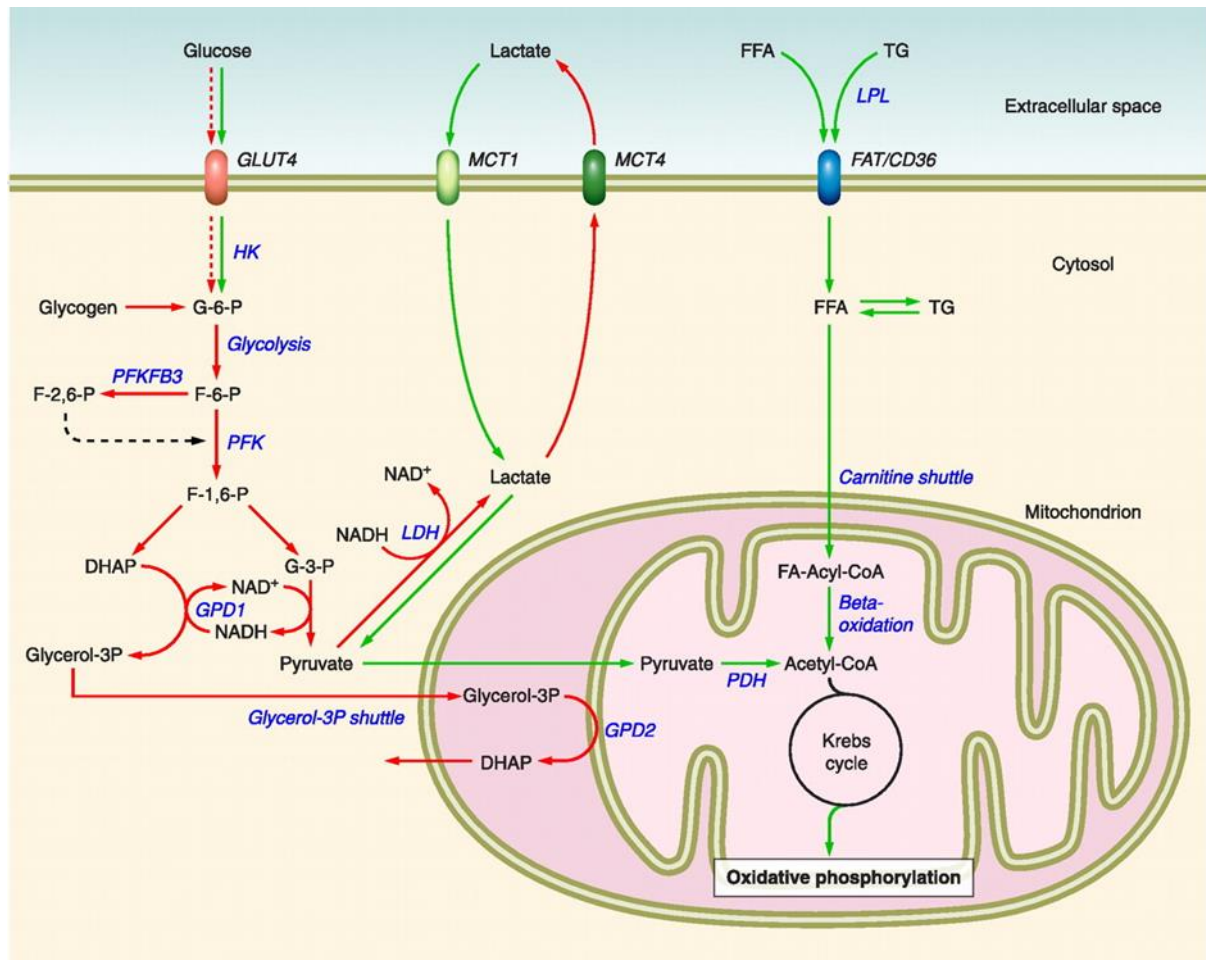


Figure 11 : Schéma décrivant les différences entre les métabolismes du glucose, du lactate et des acides gras des fibres musculaires à contraction rapide et lente. Les voies majoritairement employées par les fibres rapides sont représentées en rouge et en vert pour les fibres lentes. DHAP : dihydroxyacetone phosphate. GLUT4 : glucose transporter 4. F-6-P : fructose-6-phosphate. FAT/CD36 : fatty acid translocase. FFA : free fatty acids. F-1,6-P : fructose-1,6-bisphosphate. F-2,6-P : fructose-2,6-bisphosphate. G-3-P : glyceraldehyde-3-phosphate. G-6-P : glucose-6-phosphate. GPD1 : glycerolphosphate dehydrogenase 1 (cytoplasmic). GPD2 : glycerolphosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial). HK : hexokinase. LDH : lactate dehydrogenase. MCT : monocarboxylic acid transporter 1. MCT4 : monocarboxylic acid transporter 4. PDH : pyruvate dehydrogenase. PFK : phosphofructokinase. PFKFB3 : phosphofructokinase-fructose bisphosphatase 3. TG : triglycerides. Schiaffino & Reggiani, 2011.

La quantité de chacune de ces fibres varie au sein d'un même muscle. Par exemple, chez le bovin, le *semitendinosus* (muscle long et superficiel situé à l'arrière de la cuisse) et le *longissimus dorsi* (muscle long et fin, formant la partie moyenne de la gouttière para-vertébrale) sont plus riches en fibres de type IIB (Kirchofer *et al.*, 2002). Le ratio des types de fibres du muscle dépend de l'espèce, du fond génétique de l'individu et peut aussi être modulé par l'exercice (Schiaffino *et al.*, 1989).

La myogenèse :

La myogenèse est une succession d'étapes conduisant à la formation de l'ensemble des fibres musculaires décrites précédemment, qui constituent les muscles. Le développement du muscle squelettique est initié durant l'embryogénèse. Chez le bovin, avant le 30^{ème} jour de vie intra utérine, les myoblastes primaires ou myoblastes embryonnaires sont formés (Zhu *et al.*, 2004). Ces myoblastes primaires fusionnent pour donner des myotubes primaires qui seront à l'origine d'un faible pourcentage de fibres matures, principalement des fibres de type I. Entre 3 et 7 mois de gestation chez le bovin, la seconde vague de la myogenèse à partir des myoblastes secondaires ou fœtaux formeront la majorité des fibres du muscle squelettique. Elles forment majoritairement des fibres à contraction rapide dans les muscles sollicités lors de mouvements rapides. Une troisième vague de myoblastes peut être observée à 110 jours de gestation chez le bovin. Ces cellules sont de faible diamètre et donnent naissance aux fibres de type IIA et IIC. Elles participent aux mécanismes de développement des muscles conduisant à une importante masse musculaire des animaux de grande taille. En effet, cette troisième vague myogénique a été décrite chez le mouton, le porc, l'humain et le bovin mais n'est pas observée chez la souris ou le rat (Du *et al.*, 2010). Chez le bovin, le nombre total de fibres est déterminé dès le 180ème jour de gestation (Figure 12).

La myogenèse secondaire au stade fœtal est soumise aux perturbations subies par la mère (Zhu *et al.* 2004). En effet, chez le bovin, si le nombre de myofibres primaires est déterminé génétiquement, le nombre de fibres secondaires est soumis à des régulations épigénétiques comme la nutrition maternelle. Les effets d'une haute nutrition maternelle induit ainsi une prolongation de la prolifération des myoblastes.

Le nombre de fibres étant déterminé avant la naissance, le développement musculaire postnatal est la conséquence de l'augmentation de la taille des fibres musculaires (hypertrophie) sans formation de nouvelles fibres (hyperplasie) (Karunaratne *et al.*, 2005).

Le développement postnatal du muscle se fait par un processus de synthèse protéique mais aussi grâce aux cellules satellites. Ce sont des cellules quiescentes situées entre la lame basale et le sarcolemme des fibres matures. Leur prolifération et fusion avec des fibres musculaires existantes permet la croissance des fibres dans les premières phases de la vie. Chez l'adulte, elles participent également à la reconstruction du muscle après blessure (Aguari *et al.*, 2008; Kuang *et al.*, 2008; Yablonka-Reuveni *et al.*, 2008).

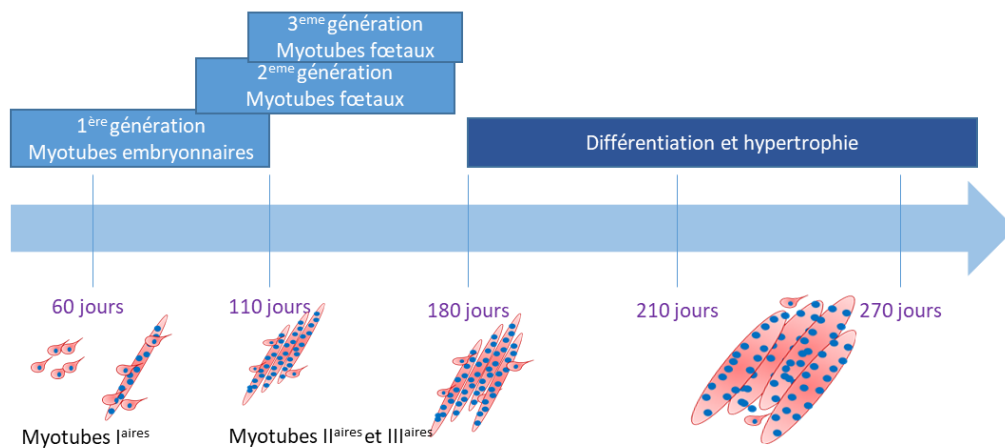


Figure 12 : Schéma illustrant les étapes de la myogenèse chez le bovin. Les jours correspondent à des jours de gestation. D'après Picard *et al.*, 2002.

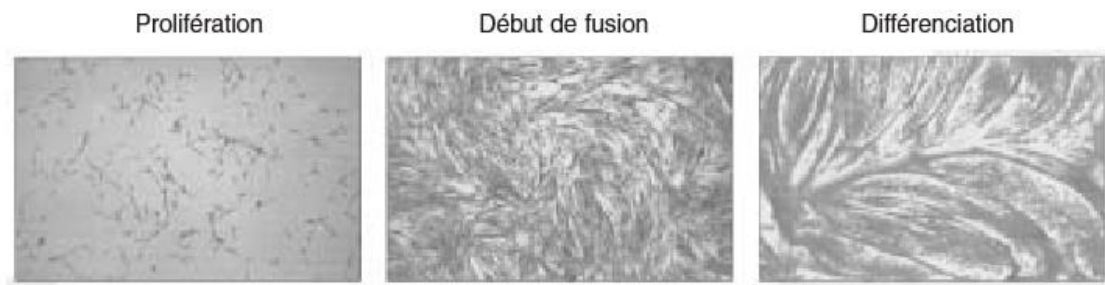


Figure 13 : Différentes étapes de la myogenèse en culture primaire de myoblastes bovins. Picard *et al.*, 1998.

Régulation de la myogenèse :

Au stade embryonnaire et fœtal, les cellules progénitrices musculaires expriment Pax3 (Paired box) et Pax7 puis ces cellules exprimeront les MRFs (Myogenic Regulatory Factor) : MyoD, Myf5 (Myogenic factor 5), myogenine et MRF4. Les MRFs sont des facteurs de transcription de la famille des bHLH (basic Helix-Loop- Helix) qui se fixent à l'ADN au niveau de la boîte E (séquence consensus : CANNNTG) des promoteurs des gènes cibles. Ils forment des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres facteurs de transcription myogéniques comme les membres de la famille des MEFs (myocyte-specific enhancer-

binding factor). Les boîtes E sont présentes dans les régions promotrices des gènes participant au développement musculaire comme MyHC ou MCK (Muscle Créatine Kinase) (Münsterberg *et al.*, 1995; Petropoulos and Skerjanc, 2002; Stern and Hauschka, 1995).

Les cellules progénitrices en prolifération expriment Pax3 et Pax7. L'expression de Myf5 et MyoD permet la détermination des cellules progénitrices en myoblastes. L'expression de MyoD provoque l'arrêt de la prolifération par l'inhibition des cyclines, et entraîne la différenciation des myoblastes en myocytes. Sous l'influence de la myogénine, les myocytes s'alignent et s'étendent puis fusionnent pour former les cellules multinuclées que sont les myotubes. Ces myotubes vont alors donner les fibres musculaires (Hatsy *et al.*, 1993; Du *et al.*, 2010) (Figure 14).

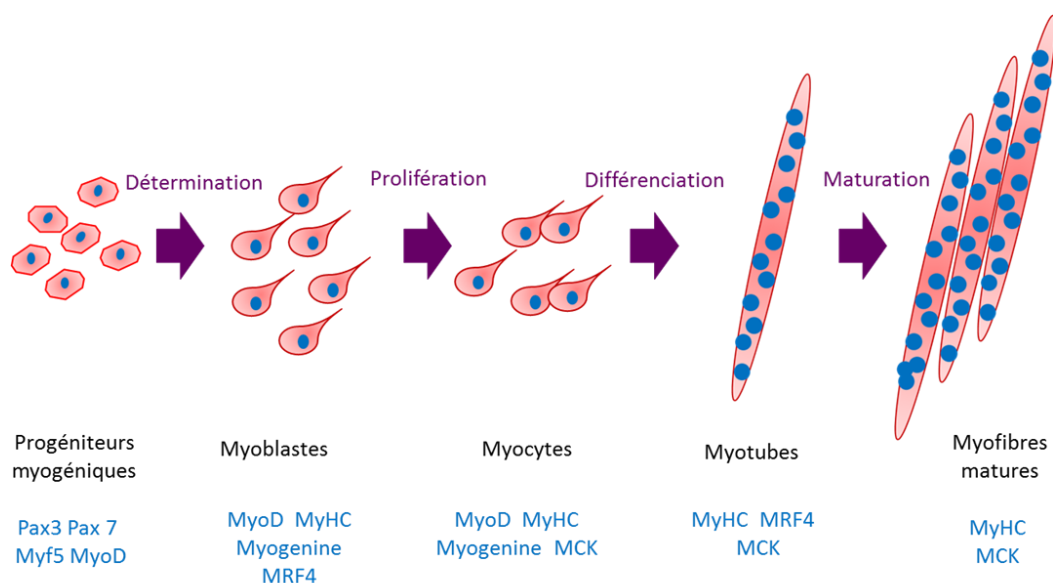


Figure 14 : Implication des facteurs de transcription myogéniques dans la myogenèse. Les processus de détermination et de différenciation des cellules progénitrices en myofibres matures sont sous le contrôle des MRFs (*Myogenic regulatory factors*). Pax3/Pax7 : *Paired box3/7* Myf 5 : *Myogenic factor 5*. MyHC : *Myosin Heavy Chain*. MRF4 : *Myogenic regulatory factor*. MCK : *Muscle creatine kinase*.

2.1.2. Régulation du développement musculaire, hypertrophie et atrophie

Le nombre de fibres est déterminé durant les phases précoces du développement mais la croissance musculaire peut être modulée durant les phases plus tardives du développement et à l'âge adulte. La masse du tissu musculaire est le résultat d'une balance entre la synthèse et la dégradation protéique. L'exercice physique, l'alimentation ou les maladies sont des facteurs environnementaux pouvant influencer la croissance ou la fonte musculaire.

De nombreux mécanismes menant à une hypertrophie ou à l'atrophie sont étudiés dans le but de corriger les maladies conduisant à une fonte musculaire chez l'homme. Chez les animaux de rente, l'étude du développement musculaire permet d'augmenter la productivité et la qualité de la viande.

De façon physiologique ou physiopathologique, plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la croissance musculaire. AKT est le facteur clé de ces voies de signalisation. En effet AKT est au carrefour de la voie AKT/mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui contrôle la synthèse protéique et de la voie AKT/FoxO au profit de la dégradation protéique (Figure 15).

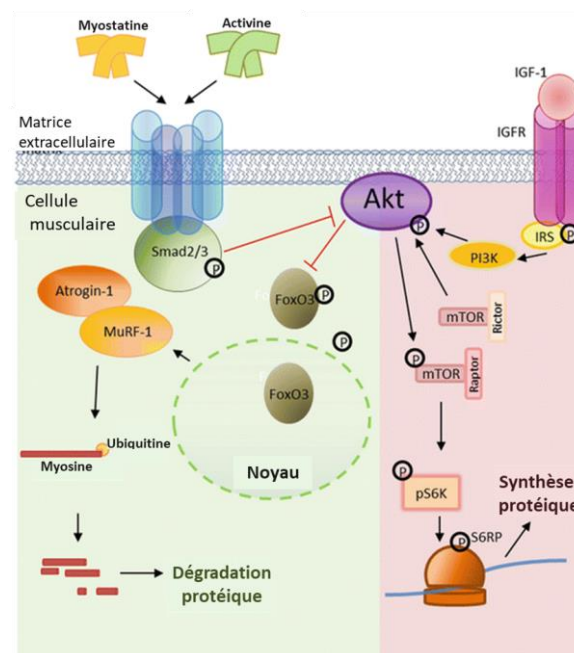


Figure 15 : Voies de signalisation impliquées dans la régulation du développement musculaire. Le développement musculaire est le résultat d'un équilibre entre synthèse et dégradation protéique. Un déséquilibre de la balance peut mener à une hypertrophie ou à une atrophie musculaire. La voie d'IGF-1 est la voie majeure de l'hypertrophie musculaire. La voie de la myostatine est la voie majeure de l'atrophie musculaire. *FoxO* : Forkhead box. *PI3K* : Phosphoinositide 3-kinase. *IRS* : Insulin Receptor Substrate. *IGF-1* : Insulin-like Growth Factor-1. *IGF1R* : Insulin-like Growth Factor Receptor *S6K* : S6 kinase *MuRF-1* : Muscle RING-finger protein-1. Chen et al., 2016.

Les voies de l'hypertrophie musculaire

L'hypertrophie musculaire est la conséquence d'une grande synthèse protéique dont résulte une augmentation de la taille des myofibres. L'hypertrophie est à différencier de l'hyperplasie qui consiste en l'augmentation du nombre de cellules. Ces deux phénomènes mènent à une augmentation de la taille du muscle mais par des mécanismes différents.

L'hypertrophie peut également provenir de la fusion des cellules satellites aux fibres existantes permettant l'augmentation du nombre de noyaux et donc de la taille des myofibres. Il est important que le ratio entre la quantité de cytoplasme et le nombre de noyaux dans ce cytoplasme soit respecté. (Schiaffino *et al.*, 2013).

- **IGF1-PI3K-AKT-mTOR**

La voie IGF1-PI3K-AKT-mTOR est la voie majeure de synthèse protéique conduisant à une hypertrophie du muscle squelettique. En effet, la sur-expression d'IGF-1 provoque une augmentation du nombre et de la taille des fibres. De ce fait, on observe une hypertrophie chez les souris transgéniques sur-exprimant IGF-1 dans le muscle squelettique (Coleman *et al.*, 1995; Musarò *et al.*, 2001). A l'inverse, l'inactivation muscle spécifique du récepteur d'IGF-1 entraîne une réduction du nombre et de la taille des fibres (Mavalli *et al.*, 2010).

IGF-1 active les voies MAPK/ERK (Extracellular signal–Regulated Kinase) et PI3K/ AKT mais seule la voie PI3K/AKT est capable de provoquer une hypertrophie (Schiaffino *et al.*, 2013). AKT stimule la synthèse protéique par l'activation de la kinase mTOR et de ses effecteurs. AKT peut induire une augmentation de la taille du muscle lors de sa sur-expression par une augmentation de la taille des fibres et une synthèse protéique accrue (Bodine *et al.*, 2001 ; Lai *et al.*, 2004). De même, l'expression d'AKT est augmentée lors de l'exercice. En conditions anaboliques, la synthèse protéique augmente grâce à la phosphorylation d'AKT et l'activation de mTOR et de pS6K (S6 kinase phosphorylée, la protéine ribosomale S6 est indispensable à la traduction et est activée par S6K). mTOR est indispensable à la signalisation IGF-1/AKT et son inhibition entraîne une annulation des effets positifs d'AKT sur la croissance (Wulschleger *et al.*, 2006). mTOR est une sérine/thréonine kinase régulatrice de la synthèse protéique dans le muscle squelettique. mTOR peut former deux complexes mTORC1 (lié à raptor) ou mTORC2 (lié à rictor). Le KO muscle-spécifique de mTOR entraîne une diminution de la croissance musculaire post-natale avec une diminution de la taille des fibres à contraction rapide (Risson *et al.*, 2009). Le KO de raptor entraîne le même phénotype que le KO de mTOR tandis que les souris rictor^{-/-} ont un phénotype normal. Ces données suggèrent que les effets de mTOR dans la synthèse protéique sont surtout liés au complexe mTORC1 (Bentzinger *et al.*, 2008). La rapamycin (un inhibiteur de mTOR) inhibe la croissance musculaire ainsi que la régénération du muscle (Bodine, 2006; Pallafacchina *et al.*, 2002). mTORC1 par phosphorylation active la protéine S6K et inhibe 4EBP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E-Binding Protein 1, protéine inhibant la traduction) provoquant la stimulation de la synthèse protéique (Hay and Sonenberg) (Figure 15). Cependant, la seule inactivation de 4EBP1 ne suffit pas à avoir un effet sur le développement du muscle.

En plus de stimuler la synthèse protéique, IGF-1 réduit l'expression de atrogin-1 entraînant une diminution du catabolisme protéique.

Les voies de l'atrophie musculaire

L'atrophie ou perte de masse musculaire peut survenir à la suite de nombreuses maladies comme les cancers, le diabète, les maladies neuromusculaires, ou de façon physiologique lors du vieillissement. Elle est caractérisée par une diminution de la masse et de la force musculaire.

Le diamètre des fibres musculaires est diminué par une réduction du contenu cellulaire (organites, cytoplasme, protéines) ou lorsque la balance synthèse/dégradation des protéines se fait en faveur de la dégradation. Les cellules atrophiées contiennent aussi moins de noyaux. Au niveau moléculaire, les voies de signalisation spécifiques conduisant à une protéolyse sont activées. L'atrophie est un processus qui requiert une régulation transcriptionnelle. Deux gènes majeurs de l'atrophie musculaire qui augmentent la protéolyse par activation du système ubiquitine/protéasome sont atrogin/MAFbx (Muscle Atrophy F-box) et MuRF1 (Muscle RING-finger protein-1). Ces gènes sont des ubiquitines ligases muscles spécifiques, marqueurs de l'atrophie musculaire et leur activation survient avant le début de la fonte musculaire. Les chaînes lourdes de la myosine sont dégradées par la protéine MuRF1. Les souris KO pour l'un des deux gènes montrent une résistance à l'atrophie causée par une dénervation. L'atrophie musculaire peut aussi avoir lieu après des phénomènes d'apoptose (Bodine and Baehr, 2014).

- **Cytokines inflammatoires et la voie NF- κ B (nuclear factor-kappa B)**

Les facteurs de transcription NF- κ B jouent un rôle central dans l'immunité et l'inflammation. Ils sont exprimés dans le muscle squelettique et modulent les effets des cytokines inflammatoires lors de la fonte musculaire. NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par les protéines inhibitrices I κ B. En réponse à TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), le complexe I κ B kinase (IKK) phosphoryle I κ B, provoquant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome ce qui induit la translocation dans le noyau de NF- κ B ainsi que son activation en tant que facteur de transcription. L'activation de NF- κ B chez la souris provoque une protéolyse ubiquitine-dépendante importante associée à une sur-expression de MuRF1 (Cai *et al.*, 2004). D'autre part, les souris NF- κ B^{-/-} sont résistantes à l'atrophie grâce à l'inactivation de MuFR1 et MAFbx (Hunter and Kandarian, 2004).

- **FoxO**

Les membres de la famille de facteurs de transcription FoxO sont des médiateurs clés de la dégradation protéique lors de l'atrophie musculaire. Dans le muscle squelettique la famille FoxO est composée de 3 isoformes FoxO1, FoxO3 et FoxO4. Leur activité est inhibée lors de la croissance musculaire par la

phosphorylation d'AKT et augmentée par sa déphosphorylation. AKT phosphoryle FoxO provoquant son exportation du noyau vers le cytoplasme donc son inactivation. La translocation et l'activité des FoxOs sont essentielles pour la régulation positive de atrogin-1/MAFbx et MuFR1. En effet, FoxO3 induit l'expression des atrogènes conduisant à une perte musculaire (Sandri *et al.*, 2004). Chez les souris sur-exprimant FoxO, une réduction de la masse musculaire ainsi qu'une atrophie des fibres sont observées. En effet, l'activation de FoxO induit une sur-expression de 4EBP1 et une sous expression de raptor et mTOR (Figure 15) (Tang *et al.*, 2014).

- **Voie Myostatine-Smad**

La myostatine est un membre de la famille des TGF- β (Transforming Growth Factor- β) et un puissant régulateur négatif de la croissance musculaire (McPherron *et al.*, 1997; Lee, 2004). Le gène de la myostatine est composé de 3 exons et de 2 introns. Le début de l'exon 1 code pour le peptide signal de la protéine, l'exon 2 et le début de l'exon 3 codent pour le propeptide et la plus grande partie de l'exon 3 code pour le domaine actif. Après dimérisation et fixation à son récepteur, la myostatine déclenche une cascade de signalisation incluant les Smads. Le dimère de myostatine se fixe au récepteur ActRIIB (Activin Receptor type II) ce qui entraîne le recrutement et l'activation du récepteur ActRII (Activin Receptor type I ou ALK, Activin-like kinase) puis le recrutement de Smad2 et Smad3. Smad2 et Smad3 activés forment alors un complexe incluant Smad4 (Figure 16). Les protéines Smad sont transloquées dans le noyau où elles activent la transcription de gènes cibles. Smad7 quant à lui agit comme un inhibiteur. En se fixant au complexe Smad2/3-Smad4, Smad7 inhibe la signalisation myostatine (Rodriguez *et al.*, 2014).

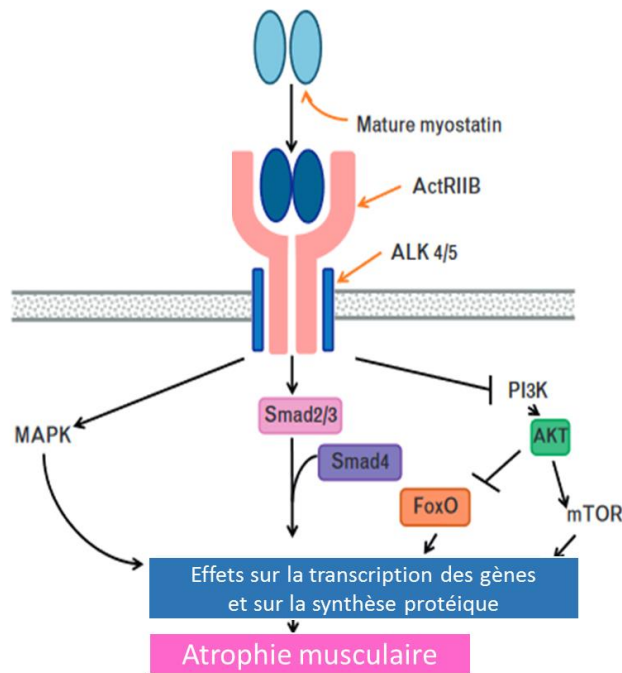


Figure 16 : Schéma de la voie de signalisation de la myostatine. Dans le muscle squelettique, la myostatine se lie à son récepteur ActRIIB qui forme un complexe avec ALK 4 et 5 entraînant l'activation de Smad 2/3 et de MAPK ainsi que l'inhibition de PI3K. Ces voies de signalisation entraînent une modulation de la transcription des gènes et de la synthèse protéique conduisant à une atrophie musculaire. *PI3K* : phosphoinositide 3-kinase, *ALK* : Activin-like kinase, *ActRIIB* : récepteur type II de l'activine, *MAPK* : Mitogen-activated protein kinases, *FoxO* : Forkhead box, *mTOR* : mechanistic target of rapamycin. D'après Smith *et al.*, 2013.

Les voies IGF1-PI3K-AKT-mTOR et myostatine-Smads sont liées. En effet, les souris myostatine^{-/-} présentent une expression et une activité d'AKT augmentée dans le muscle squelettique. De même, la sur-expression *in vitro* de la myostatine entraîne une diminution de l'hypertrophie induite par IGF-1. De plus, l'inhibition de la myostatine entraîne une activation d'AKT nécessaire à l'hypertrophie (Morissette *et al.*, 2009).



Figure 17 : Augmentation de la masse musculaire dans les membres supérieurs d'une souris myostatine^{-/-}. La souris du panneau de droite est sauvage, la souris du panneau de gauche est myostatine^{-/-}. McPherron *et al.*, 1997.

L'inactivation de la protéine myostatine, de façon expérimentale ou naturelle, résulte en une hypertrophie et une hyperplasie musculaire (Lee, 2004) (Figure 17). Le traitement des myotubes en culture avec la protéine myostatine purifiée humaine entraîne une inhibition de la synthèse protéique ainsi qu'une diminution de leur taille (Taylor *et al.*, 2001). L'injection d'anticorps anti-myostatine chez les souris *mdx* (modèle murin de dystrophie de Duchenne) entraîne une augmentation de leur masse musculaire (Bogdanovich *et al.*, 2002). De même la sur-expression de GASP-1 et de GASP-2, deux inhibiteurs naturels de la myostatine, entraînent une augmentation de la prolifération et de la fusion des cellules myoblastiques C2C12 (Brun *et al.*, 2012 ; Périé *et al.*, 2016)

Chez l'homme, le cas d'un patient présentant une hypermusculature des cuisses et des bras a été décrit. Il s'agit d'un enfant portant une mutation perte de fonction du gène de la myostatine. La mutation est une substitution G>A dans l'intron 1 conduisant à une rétention de l'intron 1 et une insertion de 108 pb contenant un codon stop prématuré dans la séquence codante. La protéine en résultant est alors inactive (Schuelke *et al.*, 2004) (Figure 18). De plus, il a été montré que les patients atteints du VIH ou en obésité morbide avait des taux de myostatine plus élevés que les sujets sains (Hittel *et al.*, 2009).

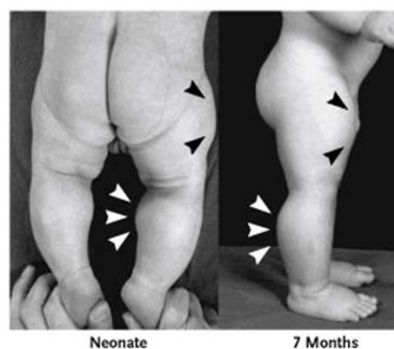


Figure 18 : Cas d'hypertrophie musculaire chez l'homme. Les flèches montrent les protubérances musculaires du patient, un garçon de 7 mois, au niveau des cuisses et des mollets. L'hypertrophie est causée par une mutation du gène de la myostatine. Schuelke *et al.*, 2004.

De nombreuses races d'animaux domestiques présentent une mutation dans le gène de la myostatine. Pour exemple, le porc Piétrain montre une hypermuscularité en lien avec un polymorphisme du gène de la myostatine (Stinckens *et al.*, 2008). Le mouton Texel présente une mutation qui crée une cible illégitime pour au moins deux micro ARNs. Il y a donc une dégradation des transcrits du gène et une diminution de la concentration de la protéine myostatine, expliquant l'hypermuscularité chez cette race de mouton (Clop *et al.*, 2006). Chez le lévrier Whippet, il existe une délétion de deux paires de bases dans le 3^{ème} exon conduisant à un codon stop prématuré. Les animaux homozygotes pour la mutation ont une musculature très développée et des performances physiques augmentées comparé aux chiens ne possédant pas la mutation (Mosher *et al.*, 2007) (Figure 19). Le phénotype hypermusclé chez le bovin

peut être également dû à des mutations de la myostatine, détaillé dans le troisième § de cette introduction bibliographique.

En plus de l'action de ces deux voies de signalisation d'IGF-1 et de la myostatine, il a été démontré dans plusieurs études l'implication des différents transcrits de PGC-1 α dans le développement musculaire chez l'homme et chez la souris.

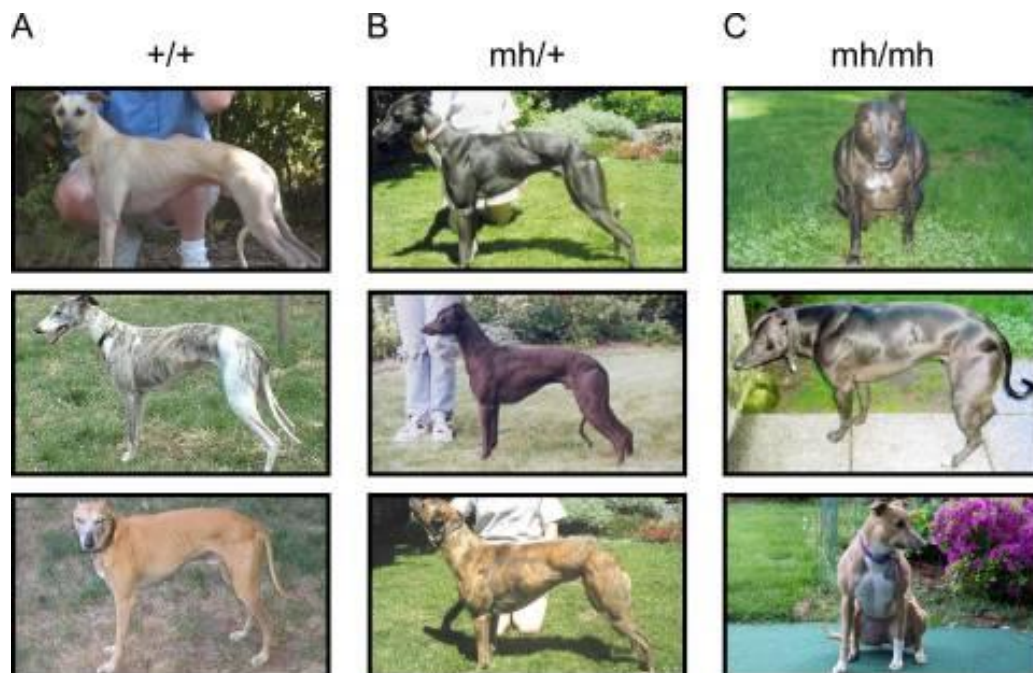


Figure 19 : Comparaison des lévriers Whippets présentant chacun des trois génotypes possibles. A, les chiens ont deux copies de l'allèle sauvage de la myostatine. B, les chiens sont hétérozygotes possédant un allèle muté et un allèle sauvage. C, les chiens sont homozygotes pour la mutation. *mh* : *muscular hypertrophy*. Mosher *et al.*, 2007.

2.2 PGC-1 α dans le muscle squelettique

L'étude de Miura *et al.*, (2008) est la première à mettre en évidence l'existence et la fonctionnalité des isoformes de PGC-1 α dérivant d'un promoteur alternatif chez la souris (Figure 20). Cette équipe a montré que les variants de PGC-1 α dérivant du promoteur alternatif étaient plus exprimés dans le muscle squelettique en réponse à l'exercice et que leur expression était augmentée par l'activation des récepteurs β -adrénergiques.

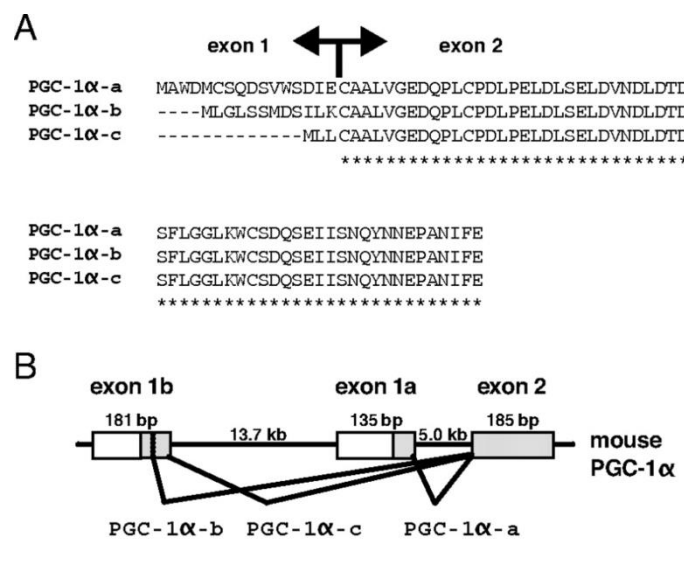


Figure 20 : Exons dérivants du promoteur proximal ou alternatif du gène PGC-1 α . A, Alignement des séquences protéiques prédictives à partir des ARNm de PGC-1 α . B, Structure schématique de la région 5' du gène PGC1- α (les carrés indiquent les exons). Miura *et al.*, 2008.

Dans le muscle squelettique murin et humain, les variants PGC-1 α 1-a, PGC-1 α 1-b, PGC-1 α 1-c et NT-PGC1 α 1-a, NT-PGC1 α 1-b, NT-PGC1 α 1-c sont exprimés (Miura *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2014; Ydfors *et al.*, 2013). Tous ces isoformes sont sur-exprimés en réponse à l'exercice.

Les kinases (AMPK, CaMK, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, p38 MAPK et Sirt-1) sont activées dans le muscle squelettique lors d'un exercice physique ce qui provoque l'augmentation de l'expression de PGC-1 α . CaMKIV et CnA (Calcineurin A) augmentent l'activité du promoteur de PGC-1 α . CaMKIV active CREB qui se lie en retour aux sites CRE (C-AMP Response Element) des promoteurs de PGC-1 α . Les exercices d'endurance entraînent une augmentation de AMPK et de p38 MAPK phosphorylée dans le noyau ce qui provoque une augmentation de la transcription de PGC-1 α . De plus, comme dans le foie, les récepteurs β -adrénergiques augmentent les niveaux intracellulaires de cAMP et activent CREB au promoteur de PGC-1 α (Herzig *et al.*, 2001)(Figure 21).

Tous ces acteurs entraînent une activation de PGC-1 α qui est capable d'activer sa propre transcription grâce à la formation de complexes avec des facteurs de transcription ou des récepteurs nucléaires et se fixe à son promoteur proximal ou distal. L'activité de la CnA, un activateur connu des protéines MEF2, est perdue lorsque le site de fixation des MEF2 du promoteur de PGC-1 α est muté. Ainsi, les effets de la CnA sur la transcription de PGC-1 α se fait donc via les MEF2. En retour, l'activité des MEF2 au promoteur de PGC-1 α est augmentée par la présence de PGC-1 α , il s'agit d'une boucle d'autorégulation positive (Handschin *et al.*, 2003)(Figure 21).

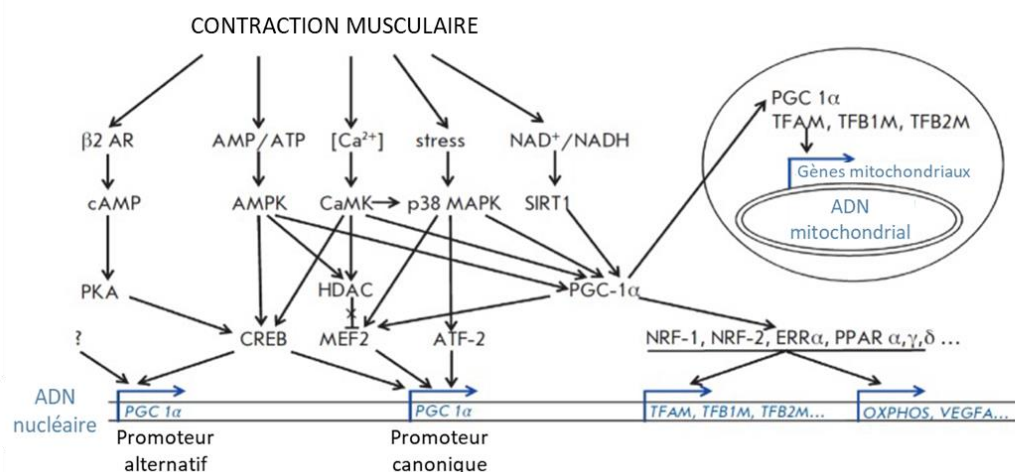


Figure 21 : Schéma représentatif de l'activation de PGC-1 α et de son expression génique dérivant de promoteur proximal ou distal. AMPK – AMP-activated protein kinase, ATF – activating transcription factor, CaMK – Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase, CREB – cAMP response element-binding protein, ERR – estrogen-related receptor, HDAC – class IIa histone deacetylase, MEF – myocyte enhancer factor, NRF – nuclear respiratory factor, OXPHOS – oxidative phosphorylation related genes, p38 MAPK – p38 mitogen-activated protein kinases, PGC – peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator, PKA – protein kinase A, PPAR – peroxisome proliferator- activated receptor, SIRT1 – NAD-dependent deacetylase sirtuin-1, TFAM – mitochondrial transcription factor A, TFB1M – mitochondrial transcription factor B1, TFB2M – mitochondrial transcription factor B2, VEGFA –vascular endothelial growth factor A, $\beta 2AR$ – $\beta 2$ -adrenergic receptor. D'après Popov *et al.*, 2015.

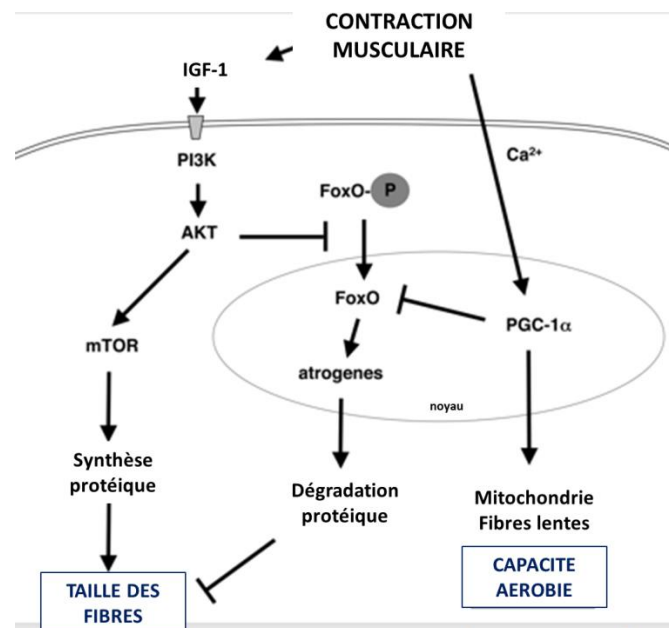


Figure 22 : Mécanisme de la croissance musculaire et de l'inhibition de l'atrophie par l'activité musculaire. L'expression de IGF-1 est augmentée dans le muscle ce qui entraîne une stimulation de la synthèse protéique et une hypertrophie des fibres via l'activation de PI3K et AKT. AKT phosphoryle FoxO ce qui provoque son exclusion nucléaire et supprime l'expression des atrogènes. L'activation de PGC-1α provoque la biogénèse mitochondriale ainsi que l'expression de fibres à contraction lente PGC-1α inhibe l'expression de FoxO. D'après Sandri *et al.*, 2006.

PGC-1α-a a la capacité de protéger le muscle contre l'atrophie. En effet, PGC-1α-a empêche la protéolyse du muscle en inhibant les expressions des atrogènes MuRF-1 et atrogin-1 (Cannavino *et al.*, 2014). La sur-expression de PGC-1α prévient l'atrophie due à une dénervation ou à la sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot) par une inhibition de l'activité et de la transcription de FoxO3 (Da Cruz *et al.*, 2012; Sandri *et al.*, 2006). PGC-1α n'a cependant pas d'effet direct sur la voie AKT/PI3K (Sandri *et al.*, 2013)(Figure 22). En revanche, la sur-expression *in vitro* des formes tronquées NT-PGC1α-a et -b entraîne la sur-expression d'IGF-1 et la sous-expression de la myostatine, les mêmes résultats sont observés quant à la sur-expression *in vivo* de NT-PGC-1α-b (Ruas *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2014)(Figure 23). PGC-1α a donc un effet sur la voie AKT/mTOR *via* la sur-expression d'IGF-1.

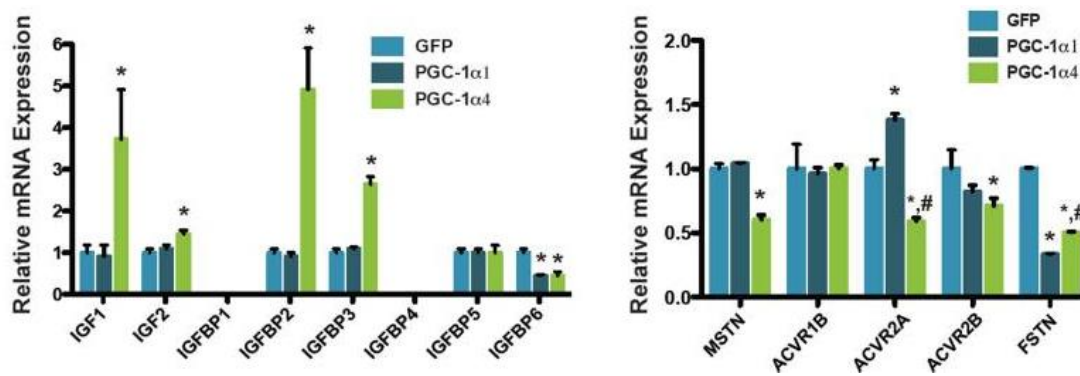


Figure 23 : Les myotubes primaires sur-exprimant NT-PGC-1α-b (PGC-1α4) présentent une sur-expression d'IGF-1 et une sous-expression de la myostatine. Ruas *et al.*, 2012.

L'expression des PGC-1α est finement régulée de façon spécifique selon le tissu et le contexte biologique. Le promoteur de PGC-1α peut être soumis à des régulations épigénétiques telles que la méthylation. Dans le muscle squelettique chez l'homme, l'exercice physique provoque une diminution de la méthylation du promoteur de PGC-1α entraînant une plus grande expression du gène (Barrès *et al.*, 2012).

La multitude de gènes dont l'expression est contrôlée par PGC-1α et les différentes voies de signalisation l'impliquant sont importantes pour l'adaptation du muscle squelettique à l'exercice (Arany *et al.*, 2008; Olesen *et al.*, 2010; Scarpulla, 2008).

2.2.1 PGC-1α et adaptation

- **Adaptation à l'exercice**

Chez l'homme et la souris, l'expression de PGC-1α est augmentée après l'exercice. L'expression préférentielle des isoformes dépend du type d'exercice. De manière générale, l'exon 1a est induit par des exercices de haute intensité et par l'activation de l'AMPK mais est insensible à la stimulation par le système β-adrénergique. L'exon 1b est plus exprimé lors d'exercices d'endurance, et est sensible au clenbuterol (β-adrénergique agoniste) et à l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide, activateur de l'AMPK)(Popov *et al.*, 2015).

La sur-expression muscle spécifique de PGC-1α-b entraîne une biogenèse mitochondriale ainsi que l'augmentation des capacités physiques. Chez l'homme, NT-PGC1α1-b (PGC-1α4) est induit aussi bien par les exercices d'endurance que de résistance (Ydfors *et al.*, 2013)(Figure 24).

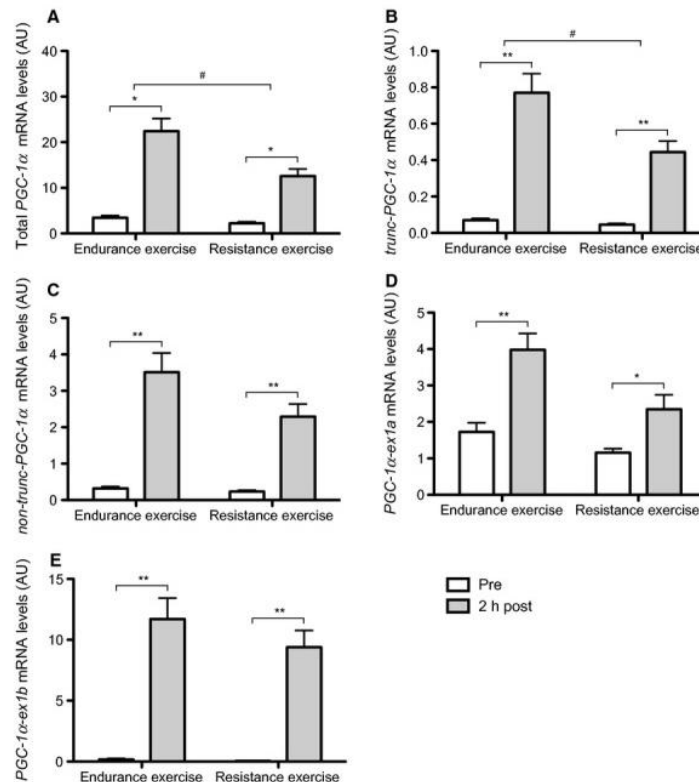


Figure 24 : Expression des formes longues ou tronquées et dérivant du promoteur proximal ou distal de PGC-1α chez l'homme. A, Quantification des ARNm des PGC-1α totaux. B, Quantification des formes tronquées. C, Quantification des formes longues. D, Quantification de l'exon 1a. E, Quantification de l'exon 1b. Ydfors *et al.*, 2013.

Les formes tronquées sont exprimées après l'exercice, cependant la protéine NT-PGC-1α-b (ou PGC-1α4) n'est pas toujours détectée (Barone *et al.*, 2016; Ruas *et al.*, 2012).

Une lignée murine transgénique sur-exprimant PGC-1α-b dans le muscle squelettique a été créée dans le but d'étudier les capacités physiques des souris. Les capacités développées sont équivalentes à celles développées lors d'exercices physiques prolongés. Les muscles des souris ont alors une biogénèse mitochondriale ainsi qu'une densité capillaire accrue ce qui suggère qu'elles sont capables d'efforts physiques efficaces et prolongés (Calvo *et al.*, 2008; Tadaishi *et al.*, 2011). Les résultats concernant les lignées transgéniques dont le gène PGC-1α est mis sous le contrôle du promoteur de la MCK diffèrent. En effet, la MCK étant plus exprimée dans les fibres à contraction lente, PGC-1α est alors plus exprimé dans les muscles possédant une plus forte proportion de fibres à contraction lente.

La différence de protocole d'entraînement peut mener à des résultats différents concernant les profils d'expression des différents isoformes de PGC-1α. Dans l'étude de Ruas *et al.* (2012), les souris sur-exprimant PGC-1α-a sont plus tolérantes à l'exercice (durée et distance) que les souris sur-exprimant NT-PGC-1α-b. Dans l'étude de Barone *et al.* (2016), les souris entraînées ont une expression augmentée

de PGC-1 α -a, de PGC-1 α -b et de PGC-1 α -c mais pas de NT-PGC-1 α -b. Dans l'étude de Wen *et al.* (2014), les souris entraînées montrent une plus grande expression de toutes des formes longues et tronquées de PGC-1 α . L'étude des formes entières de PGC-1 α est techniquement très complexe. De ce fait, l'étude de Ydfors *et al.* (2013), montre une quantification des formes tronquées ou longues indépendamment de la quantification de l'exon 1a ou de l'exon 1b. Dans cette étude, il est prouvé que toutes les formes de PGC-1 α sont augmentées à l'exercice chez l'homme (Figure 24). Alors qu'il avait été précédemment montré que, chez l'homme, l'exercice entraîne une expression préférentielle de NT-PGC-1 α -b (Ruas *et al.*, 2012).

- **Adaptation à de fortes températures**

L'implication de PGC-1 α dans la thermogenèse adaptative a longtemps orienté les conditions d'étude de PGC-1 α dans un contexte d'exposition au froid. Or, l'expression de PGC-1 α est aussi modulée par l'exposition à la chaleur. A l'exercice, la température du muscle peut monter jusqu'à 40°C en conditions physiologiques. Une élévation de la température du muscle au repos mime donc les effets de l'effort physique. Ainsi, le stress causé par une élévation de la température dans les C2C12 et dans les muscles chez l'homme provoque l'activation de l'AMPK et PGC-1 α ainsi qu'une biogénèse mitochondriale (Hafen *et al.*, 2018; Liu and Brooks, 2012). De plus, l'exposition à des températures élevées après un exercice physique potentialise ces effets (Tamura *et al.*, 2014).

- **Adaptation à l'horloge biologique**

L'expression de PGC-1 α est directement sous l'influence de la contraction musculaire et de la disponibilité en nutriments qui sont eux-mêmes sous le contrôle de l'horloge circadienne. L'étude de Liu *et al.* (2007) propose un modèle dans lequel PGC-1 α stimule l'expression des gènes de l'horloge circadienne. En retour, les gènes de l'horloge contrôlent l'expression de PGC-1 α . En effet, PGC-1 α contrôle la durée de période d'un cycle circadien (24h chez l'homme). Des études ont montré que les gènes de l'horloge sont actifs dans le muscle et nécessaires à l'expression des gènes de la structure et du métabolisme musculaire (Lefta *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2007).

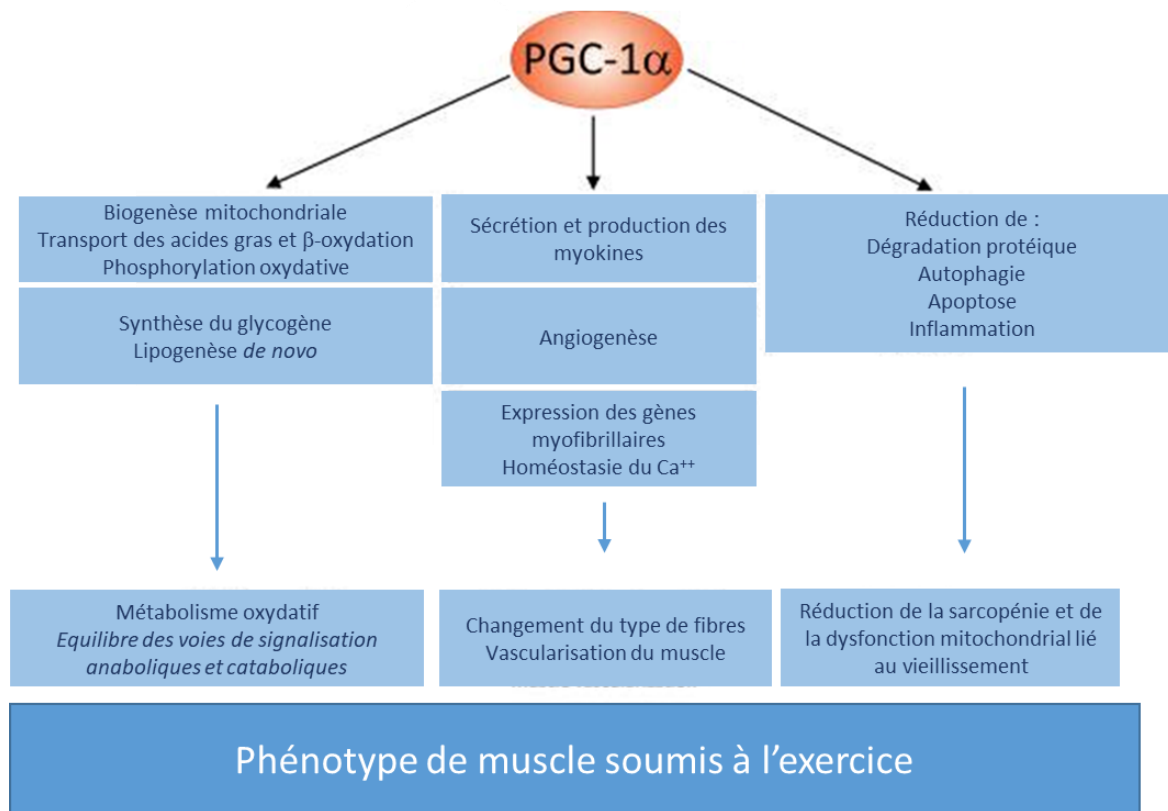


Figure 25 : Rôle central de PGC-1α dans la régulation de la plasticité des cellules musculaires squelettiques. Toutes les voies de signalisation majeures activées par la contraction musculaire entraînent la modulation de l'expression du gène de PGC-1α associé à des modifications post-traductionnelles de la protéine. En retour, PGC-1α coordonne le réseau transcriptionnel contrôlant le programme de remodelage du muscle induit par l'exercice. Schnyder *et al.*, 2015.

2.2.2 PGC-1α et typage de fibre

Le muscle squelettique est un muscle plastique capable d'adaptation. Une étude menée en 2011 chez des hommes jeunes et en bonne santé montre que les exercices d'endurance et de résistance mimés par la stimulation électrique neuromusculaire entraînaient une hypertrophie, un changement du typage de fibre au profit des fibres de type IIA et I et une augmentation des défenses intracellulaires contre les espèces réactives de l'oxygène (Gondin *et al.*, 2011). Le type d'exercice entraîne différentes modifications du muscle squelettique. Ces modifications concernent la modulation de l'expression des protéines myofibrillaires et des enzymes métaboliques. En effet, les exercices d'endurance entraînent un changement de l'expression des isoformes de MyHC de rapide à lente. Les exercices de résistance, quant à eux, entraînent une hypertrophie et un gain de force musculaire. Comme évoqué précédemment, les fibres de type I expriment l'isoforme MyHC I et sont des fibres lentes oxydatives. Elles contiennent beaucoup de mitochondries, sont plus sensibles à l'insuline (beaucoup de

transporteurs de glucose GLUT4) et ont une densité capillaire plus grande. Les fibres de type II expriment l'isoforme MyHC IIa et sont des fibres rapides sollicitées lors d'exercices d'endurance, contenant de nombreuses mitochondries. Les fibres IIB expriment l'isoforme MyHC IIb et sont des fibres à contraction rapides mobilisées lors d'exercices de résistance. Elles sont rapidement fatigables, génèrent l'énergie de façon glycolytique et contiennent peu de mitochondries.

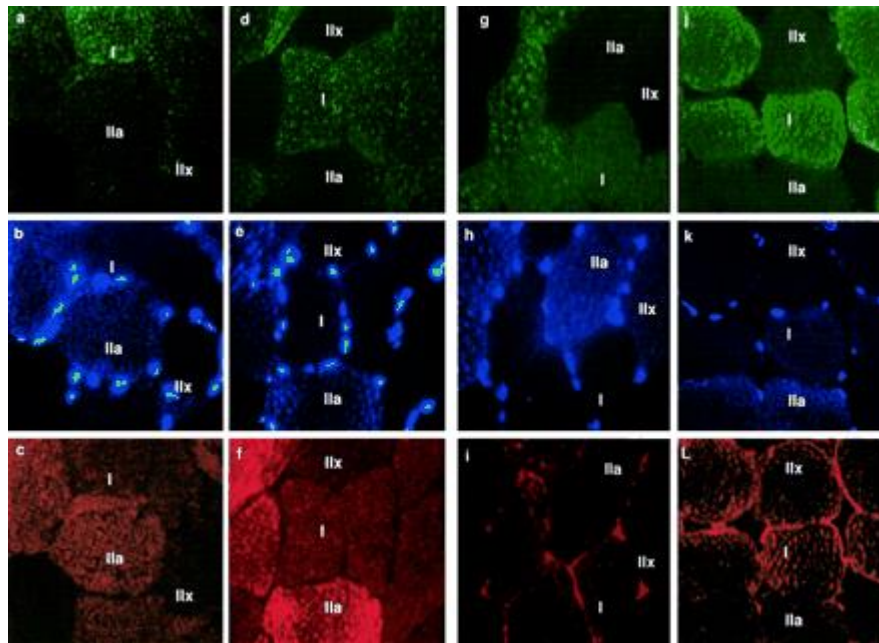


Figure 26 : Triple marquage immunohistochimique des isoformes des chaînes lourdes de la myosine.

Les fibres de type I sont marquées en vert, les fibres de type IIA sont marquées en bleu, les fibres de type IIX ne sont pas marquées. Les panneaux c et f montrent l'expression de PGC-1 α avant et après l'exercice physique, i et l montrent PPAR- α avant et après l'exercice. Les marquages sont effectués sur des coupes de muscle vaste latéral prélevés par biopsie chez l'homme. Russel *et al.*, 2003

Chez l'homme, PGC-1 α est exprimé différemment en fonction du type de fibre mais aussi avant et après un exercice d'endurance. La protéine PGC-1 α a une concentration décroissante dans les fibres de type IIA, de type I et de type IIX. PGC-1 α est plus exprimé dans les fibres de type IIA, moins dans les fibres de type I et encore moins dans les fibres de type IIX (Russell *et al.*, 2003) (Figure 26).

La sur-expression de NT-PGC1 α -a dans les myotubes en culture entraîne la sur-expression des isoformes MHC IIa et I associée à la sous-expression de MHC IIb MHC IIx. (Wen *et al.*, 2014) (Figure 27). Tandis que la sur-expression muscle spécifique de NT-PGC1 α -b induit l'expression de MHC IIa et IIx au détriment de MHC IIb (Ruas *et al.*, 2012) (Figure 28). La sur-expression de PGC-1 α de façon spécifique dans les fibres de type II entraîne l'activation d'un programme spécifique des fibres de type I (plus de mitochondries et une plus grande expression de la Troponine I, marqueur des fibres de type I (Lin *et al.*, 2002b).

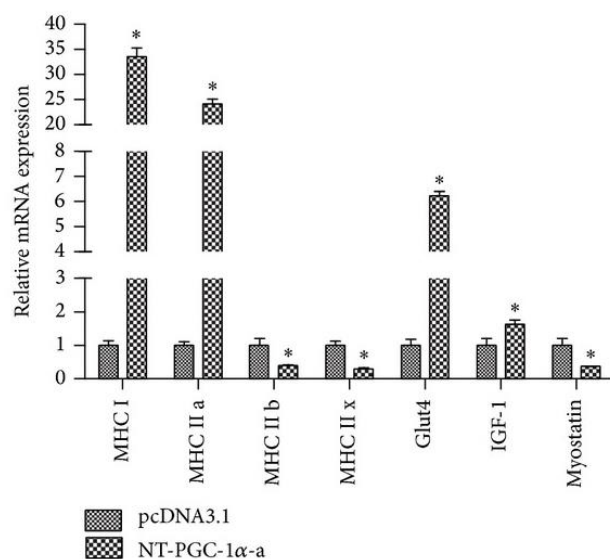


Figure 27 : NT-PGC-1 α -a induit l'expression des MyHC I, IIa et réduit l'expression de MyHC IIb et IIx dans les cellules C2C12. Wen *et al.*, 2014.

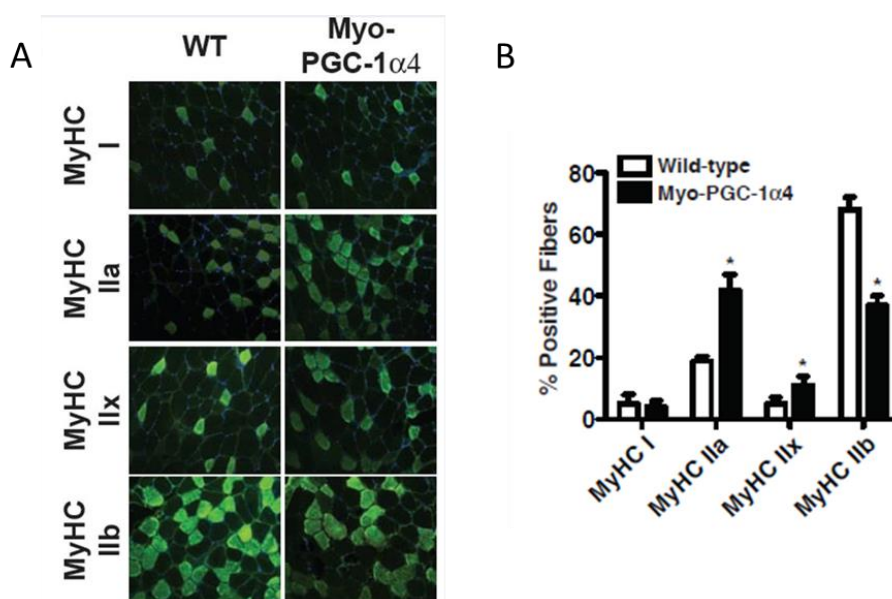


Figure 28 : Marquage immunohistochimique de muscle *gastrocnemius* de souris sauvage (WT) et de souris sur-exprimant NT-PGC-1 α -b de façon muscle spécifique (Myo-PGC-1 α 4). A, Les anticorps utilisés ciblent les différentes chaînes lourdes de la myosine (MyHC I, IIa, IIx, IIb) B, Quantification des différentes isoformes de la myosine. Ruas *et al.*, 2012.

PGC-1 α est donc impliqué dans le changement de typage de fibres. Le typage de fibres est important pour les caractéristiques organoleptiques de la viande (Renand *et al.*, 1997). De plus, le profil de type

de fibres est différent entre les animaux hypermusclés et ceux de phénotype conventionnel. En effet, les animaux hypermusclés présentent une plus faible proportion de fibres de type I et une plus grande proportion de fibres de type II (Martyn *et al.*, 2004).

3. CARACTERISTIQUES DES BOVINS HYPERMUSCLES, IMPLICATION DE PGC-1 α ?

Une sélection des animaux sur des caractéristiques morphologiques a mené à l'établissement et à la stabilisation de races « culardes » dont les caractères sont transmissibles génétiquement (Figure 30). Le locus *mh* (muscular hypertrophy, hypertrophie musculaire) est associé à ce phénotype culard. Les allèles de ce locus sont récessifs ce qui implique que les animaux hypermusclés sont de génotype *mh/mh* tandis que les animaux présentant un phénotype conventionnel sont de génotype *+/+* ou *+/mh*. Le gène de la myostatine est localisé dans ce locus. Chez le bovin, le phénotype hypermusclé observé chez les races allaitantes est souvent dû à des mutations perte de fonction sur l'exon 3 du gène de la myostatine (Grobet *et al.*, 1997, 1998; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997) (Figure 31).

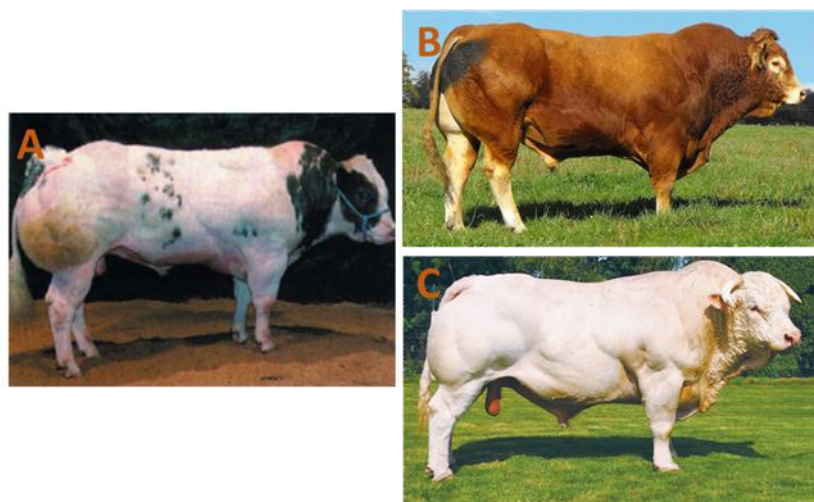


Figure 30 : Trois grandes races de vaches allaitantes. A, Blanc Bleu Belge. B, Limousine. C, Charolaise

Pour la race Blanc Bleu Belge, la mutation est une délétion de 11 nucléotides nt812(del11) dans l'exon 3 introduisant un codon stop prématuré et conduisant à la production d'une forme tronquée et inactive de la myostatine. La mutation C313Y des races Piémontaise et Gascogne ainsi que la mutation E291X de la race Marchigiana dans l'exon 3 correspondent à des changements d'acides aminés et produisent des formes inactives de la protéine. La mutation C313Y correspond à une substitution G→A entraînant le remplacement d'une cystéine par une tyrosine ce qui empêche la protéine d'acquies sa conformation active. Tandis que la mutation E291X est une substitution G→T introduisant un codon

stop prématuré. La mutation Q240X en race Charolaise du gène de la myostatine située dans l'exon 2 entraîne la substitution d'une glutamine par un codon stop et la perte de fonction de la protéine. Certaines races bovines peuvent présenter plusieurs mutations du gène de la myostatine. C'est par exemple le cas de la Limousine, elle présente la mutation nt812(del11) retrouvée chez la race Bleu Blanc Belge. Mais elle présente aussi une mutation F94L dans le premier exon qui n'est pas associée à un phénotype hypermusclé ainsi qu'une mutation silencieuse Nt414(C-T). Ou encore de la race Charolaise qui présente la mutation Q204X dans l'exon 2 introduisant un codon stop prématuré et la mutation silencieuse Nt414(C-T) (Grobet *et al.*, 1998; Joulia-Ekaza *et al.*, 2006; Karim *et al.*, 2000). Malgré leur phénotype culard, les bovins de la race Blonde d'Aquitaine ne présentent pas de mutations dans les parties codantes de la myostatine. La mutation responsable du phénotype hypermusclé des bovins Blonds d'Aquitaine sera détaillée plus tard dans cet exposé bibliographique.

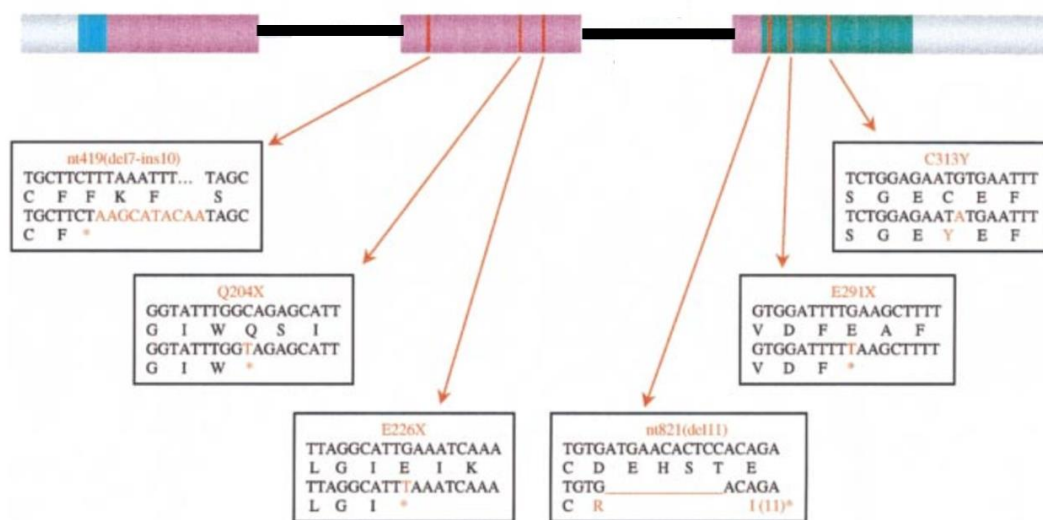


Figure 31 : Représentation schématique du gène bovin de la myostatine. Les carrés représentent les exons (bleu : peptide signal ; rose : propeptide ; vert : partie bioactive). Les lignes noires correspondent aux introns. La séquence correspondant à six mutations perte de fonction du gène sont pointées par les flèches rouges. D'après Grobet *et al.*, 1997.

Ces bovins culards *mh/mh* présentent une hypertrophie musculaire. Ils partagent, malgré les différentes races, des caractéristiques communes, comme un poids de naissance plus élevé. En dépit de leur hypertrophie musculaire globale, il existe une différence de répartition de la masse musculaire. En effet, les membres postérieurs présentent un plus fort développement musculaire (muscle de la cuisse *semitendinosus*) ainsi que les muscles superficiels (comme le longissimus dorsi, muscle du dos). Le diaphragme et les muscles intercostaux manifestent une tendance au sous-développement, conduisant à une hypoventilation et à un état d'hypoxie (Boccard *et al.*, 1974)

Les bovins culards présentent un meilleur ratio masse maigre/masse grasse. Ils n'ont pas de tissu adipeux sous-cutané et très peu entre les fibres musculaires et en intra-abdominale. Les dépôts de graisse intramusculaire, « le persillage », contribue à une meilleure saveur de la viande. Les animaux hypermusclés ont aussi une teneur en collagène inférieure ; le collagène contribue au maintien du muscle mais rend aussi la viande moins tendre (Boccard *et al.*, 1974).

Les différences de distribution des types de fibres musculaires ont des effets sur la tendreté de la viande. Par exemple dans le *longissimus thoracis*, la tendreté est associée à une augmentation du métabolisme oxydatif (fibres de type I). En effet, il a été montré chez le bœuf Hanwoo, un persillage plus important quand la proportion de fibres de type I est augmenté au détriment des fibres de type IIA et IIB (Hwang *et al.*, 2010). Chez les races d'élevage françaises, il a été également montré que plus l'activité oxydative du muscle (fibres de type I) est importante, plus la viande est tendre (Chriki *et al.*, 2012). Les animaux hypermusclés présentent globalement une plus grande proportion de fibres de type II (glycolytique) (Gagnière *et al.*, 1997).

L'équilibre des différents facteurs modulant la qualité de la viande sont à prendre en compte lors de la sélection des animaux. La sélection favorable des bovins présentant le caractère culard a eu lieu lorsque la demande commerciale a supplanté les risques accrus de leur élevage. En effet, les bovins culards présentent des problèmes de fertilité, des problèmes de vêlage (naissances par césariennes plus nombreuses), une baisse de la viabilité des veaux ainsi qu'une plus grande fatigabilité à l'exercice (Lauvergne *et al.*, 1963). Ils sont cependant domestiqués pour leur viande car l'élevage de ces bovins culards est rentable d'un point de vue économique.

Historiquement, les études se sont portées sur les mutations associées au gène de la myostatine pour relier la génétique au phénotype hypermusclé. Il existe cependant une variabilité d'expression du caractère culard qui se manifeste par une variabilité phénotypique ainsi qu'une différence d'expression des caractères délétères intra et inter espèces, c'est le cas de la race Blonde d'Aquitaine.

La race Blonde d'Aquitaine est une race établie depuis 1962 provenant de la fusion de trois rameaux : la Garonnaise, la Quercy et la Blonde des Pyrénées. L'UPRA Blonde d'Aquitaine est créé en 1972 (Unités Nationales de Sélection et de Promotion de Race - aujourd'hui Organisme de Sélection). Ses missions sont, en autres, d'apporter une expertise, des filières jusqu'au consommateur, de promouvoir la race et d'apporter un appui génétique aux éleveurs. En 2014, la race comptait 500 000 vaches en France. La Blonde d'Aquitaine est cependant élevée partout dans le monde où ses qualités bouchères sont appréciées. La viande de la Blonde d'Aquitaine est appréciée car peu grasse et tendre. Il s'agit d'un produit labellisé sous le terme « Bœuf Blond d'Aquitaine ».

La Blonde d'Aquitaine est une race également appréciée des éleveurs puisqu'elle ne présente que peu de difficultés d'élevage : les animaux sont dociles, ont une bonne productivité numérique, une bonne longévité et une grande facilité de vêlage. La grande vitesse de croissance et l'excellent rendement à l'abattage font de ces animaux une race rentable. De plus, les animaux ont une bonne capacité d'adaptation aux différents climats ce qui facilite leur élevage.

La Blonde d'Aquitaine peut être utilisée en race pure ou en race de croisement. En effet, elle peut servir, par croisement, à améliorer la morphologie et la croissance d'autres races. Elle s'utilise en croisement terminal pour garantir une bonne conformation des animaux avant abattage. Ainsi, les animaux gagnent en poids de carcasse, ont un rendement carcasse supérieur et ont un développement plus précoce, permettant d'avancer l'âge de l'abattage (sources : AgroParisTech et Organisme de Sélection Blond d'Aquitaine).

Si pendant longtemps les études ont recherché la mutation responsable de l'hypermuscularité de la Blonde d'Aquitaine dans les parties codantes de la myostatine, c'est dans notre laboratoire qu'a été mise en évidence la mutation en 2014 (Bouyer *et al.*). Cette mutation Blonde d'Aquitaine est singulière : il s'agit d'une substitution T>G dans l'intron 2 créant un site illégitime d'épissage entraînant la rétention d'une partie de l'intron dans le transcrit. La partie intronique retenue code pour un codon stop prématuré conduisant à une protéine myostatine tronquée de toute sa partie bio active (Bouyer *et al.*, 2014). Cette mutation est fixée dans la race Blonde d'Aquitaine. Les animaux homozygotes pour cette mutation sont hypermusclés mais ne présentent pas le phénotype extrême retrouvé chez la Bleu Blanc Belge. De plus, parmi ces individus hypermusclés, il existe une grande variabilité phénotypique intra-race (du plus musclé au moins musclé) (Figure 32).



Figure 32 : Taureaux Blonds d'Aquitaine. A, Taureau présentant un score de développement musculaire à 18 mois de 129. B, Taureau présentant un score de développement musculaire à 18 mois de 97. Le score de développement musculaire traduit la conformation musculaire en vif en fin d'engraissement.

Ceci sous-entend l'implication d'autres gènes dans la régulation de la masse musculaire chez le bovin. Ces arguments ont conduit notre équipe à s'intéresser à l'étude de PGC-1 α chez le bovin.

Le gène PGC-1 α bovin est localisé sur le chromosome 6 (brin anti-sens : 44,854,113-44,960,668). La structure du gène a été décrite comme étant composé de 13 exons dont l'expression est contrôlée uniquement par un promoteur proximal (Weikard *et al.*, 2005)(Figure 33). Chez le bovin, les données génomiques ont montré que le gène PGC-1 α comportait des SNPs reliant certains polymorphismes à la production de lait et à la croissance (Li *et al.*, 2016).

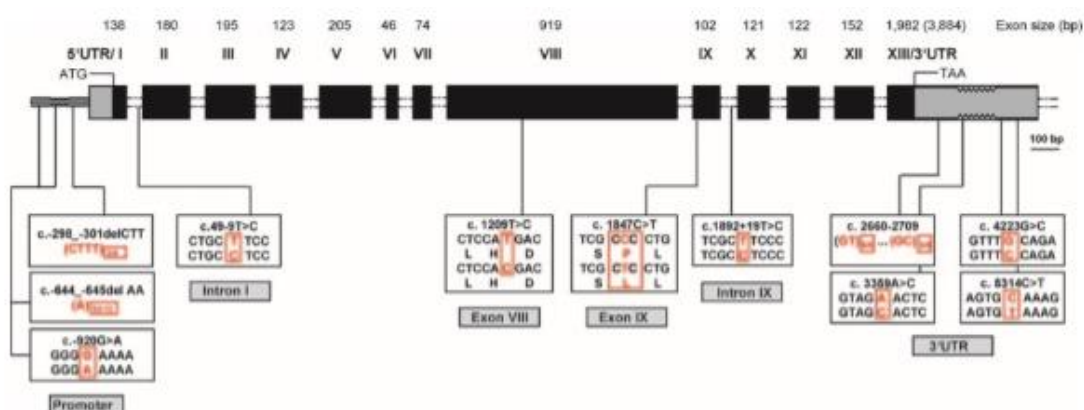


Figure 33 : Structure du gène PGC-1 α bovin. Les boîtes noires correspondent aux exons, les séquences correspondent aux SNP décrits dans l'article. Weikard *et al.*, 2005.

Les connaissances concernant le gène PGC-1 α bovin étant limitées comparé au gène humain et murin, l'objectif premier de mes travaux de thèse a été de réaliser une étude *in silico* à partir des bases de données afin de mettre en évidence les différents transcrits potentiels exprimés chez le bovin. Ensuite mes objectifs ont été (1) de mettre en évidence expérimentalement les transcrits alternatifs de PGC-1 α exprimés chez le bovin, (2) d'étudier leur distribution et leur niveau d'expression musculaire et (3) d'analyser leur implication dans le développement musculaire en mettant en place un modèle d'étude *in vitro*.

RESULTATS

Résultats

Comme évoqué précédemment, il existe une grande variabilité phénotypique au sein de la race Blonde d'Aquitaine (Bouyer *et al.*, 2014). Des travaux menés dans notre laboratoire ont mis en évidence la mutation perte de fonction du gène de la myostatine associée au phénotype hypermusclé de cette race (Bouyer *et al.*, 2014). Nous avons aussi montré qu'en dépit de la variabilité phénotypique des animaux, 95% d'entre eux portaient la mutation. Les mutations, naturelles ou expérimentales, entraînant un défaut de la production de la myostatine conduisent à des phénotypes extrêmes, comme chez la Bleu Blanc Belge. Les animaux Blonde d'Aquitaine présentent une hypermusculature plus modérée, suggérant que la mutation de la myostatine ne serait pas la seule responsable de ce phénotype. Afin d'expliquer le phénotype des Blondes d'Aquitaine, nous avons ciblé le gène PGC-1 α dans une approche gène-candidat. Ce coactivateur de facteurs de transcription, et plus particulièrement le variant PGC-1 α 4, est connu chez la souris pour entraîner une hypertrophie musculaire mais aussi pour entraîner la sous expression de la myostatine et la sur expression d'IGF-1 (deux grands acteurs de la régulation du développement musculaire) (Ruas *et al.*, 2012).

L'implication de PGC-1 α et de ses différents variants dans le développement musculaire chez l'homme et chez la souris ont orienté mes travaux de thèse sur l'étude de PGC-1 α dans le développement musculaire chez le bovin. Nos objectifs ont été (1) de mettre en évidence les transcrits alternatifs de PGC-1 α exprimés chez le bovin, (2) d'étudier leur distribution tissulaire et leur niveau d'expression musculaire et (3) d'analyser leur implication dans le développement musculaire en mettant en place un modèle d'étude *in vitro*. L'ensemble de ce travail a donné lieu à un article publié dans le journal à comité de lecture GeneReports.

Accepted Manuscript

Overexpression of both full-length or truncated isoforms of bovine PGC-1alpha enhances myoblasts differentiation

Jessica Bamba, Alexis Parenté, Nathalie Duprat, Lionel Forestier, Véronique Blanquet



PII: S2452-0144(18)30133-X
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.10.012>
Reference: GENREP 336
To appear in: *Gene Reports*
Received date: 4 August 2018
Revised date: 3 October 2018
Accepted date: 25 October 2018

Please cite this article as: Jessica Bamba, Alexis Parenté, Nathalie Duprat, Lionel Forestier, Véronique Blanquet, Overexpression of both full-length or truncated isoforms of bovine PGC-1alpha enhances myoblasts differentiation. Genrep (2018), <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.10.012>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



Overexpression of both full-length and truncated isoforms of bovine PGC-1 α enhances myoblasts differentiation

Jessica Bamba, Alexis Parenté, Nathalie Duprat, Lionel Forestier, Véronique Blanquet*

Univ. Limoges, INRA, PEIRENE EA7500, USC1061 GAMAA, F-87000 Limoges, France



ARTICLE INFO

Keywords:

PPARGC1A
PGC-1 α
Bovine
Skeletal muscle

ABSTRACT

The transcriptional co-activator PGC-1 α has been reported to play a key role in adaptive thermogenesis and to influence muscle homeostasis and growth in mouse and human. PGC-1 α has a complex structure with multiple protein domains whose gene is controlled by two promoters and is subject to alternative splicing events. In cattle, very little is currently known about PGC-1 α , the only available data are putative transcripts. So, the aim of our study was to investigate the presence and the structure of bovine PGC-1 α alternative transcripts. We found different transcripts, two full-length isoforms named PGC-1 α -a and PGC-1 α -b, and two truncated forms, NT-PGC-1 α and PGC-1 α 4. In basal conditions, our results showed that the truncated forms are the most expressed in bovine muscle. In addition, the transcripts derived from the proximal promoter are predominant, suggesting that NT-PGC-1 α would be the main form. Finally, we showed that the overexpression of either full-length or truncated isoforms of bovine PGC-1 α enhances myoblasts differentiation. The multiplicity of isoforms resulting from PGC-1 α as well as their implication in myogenesis makes PGC-1 α as a gene of interest for the study of the muscular phenotypic variability found in different cattle breeds.

1. Introduction

Improving the productivity and quality of animal products is an important issue for livestock farming. Furthermore, modifications of the environment (climate, food resources, rearing conditions) require more adaptation from animals. The muscle tissue, which represents more than half of the body mass of most mammals, is a major component of metabolic homeostasis in close association with other tissues/organs. Muscle tissue also shows high plasticity thus contributing to adaptation. The current state of the research does not exploit all the possible interactions between the elements affecting the function and the adaptive processes of the skeletal striated muscle. A better knowledge of the mechanisms controlling muscle growth is therefore necessary. In this context, we undertook a gene candidate approach associated with comparative genetics, leading us to study the PPARGC1A (PPAR- γ Coactivator 1 Alpha) gene, also named PGC-1 α . PGC-1 α is a member of the PGC-1 family of nuclear receptor coactivators. This family is composed of 3 genes which code for PGC-1 α , PGC-1 β and PGC-1-related coactivator (PRC) proteins. Members of the PGC-1 family have the ability to interact with many different transcription factors, so they act on distinct biological programs in different tissues (Lin et al., 2005).

The first member of the PGC-1 family identified was PGC-1 α

(named at present PGC-1 α -a) through its interaction with PPAR- γ . In mouse, PGC-1 α -a is composed of 13 exons from the first exon1a to the 13th with an expression limited to certain tissues and physiological conditions. PGC-1 α is predominantly expressed in tissues with abundant mitochondria, such as heart, brown adipose tissue, skeletal muscle, kidney, and liver (Knutti and Kralli, 2001). This protein has been shown to play a key role in adaptive thermogenesis (Puigserver et al., 1998). In muscle, PGC-1 α is activated in response to exercise through the increase in oxidative capacity and mitochondrial protein (Lin et al., 2002a, 2002b; Calvo et al., 2008). However, no difference in myotubes size was observed in primary myoblasts overexpressing murine PGC-1 α (Ruas et al., 2012). Two coactivators PGC-1 β and PRC were discovered both structurally and functionally related to PGC-1 α (Andersson and Scarpulla, 2001; Lin et al., 2002a, 2002b). Although that PGC-1 α and -1 β share similar tissue patterns with a high expression in heart and brown adipose tissue, they have distinct roles in brown fat differentiation and in adaptive thermogenesis (Lin et al., 2002a, 2002b). PGC-1 β is also implicated in mitochondrial biogenesis but is insensitive to exercise (Shao et al., 2010; Mortensen et al., 2007). Regarding PRC, unlike PGC-1 α , it is ubiquitously expressed in murine tissues and cell lines and its expression responds to exercise by adaptation in glucose and fatty acid metabolism (Andersson and Scarpulla,

Abbreviations: PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1-alpha; NT, N-truncated

* Corresponding author at: Univ. Limoges, INRA, PEIRENE EA7500, USC1061 GAMAA, 123, av. A. Thomas, F-87060 Limoges Cedex, France.

E-mail address: veronique.blanquet@unilim.fr (V. Blanquet).

<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.10.012>

Received 4 August 2018; Received in revised form 3 October 2018; Accepted 25 October 2018

Available online 06 November 2018

2452-0144/ © 2018 Published by Elsevier Inc.

2001). In addition, PRC also regulates myogenesis by increasing myoblast proliferation (Philp et al., 2011). Altogether, those members besides being implicated in metabolism have an effect on muscle development.

Multiple promoter regions and alternative splicing control PGC-1 α gene, leading to PGC-1 α -a, PGC-1 α -b, PGC-1 α -c, NT-PGC-1 α -a (named NT-PGC-1 α) and NT-PGC-1 α -b (named PGC-1 α 4) mRNA isoforms (Miura et al., 2008; Popov et al., 2015). The proximal promoter directs the transcription of the first exon (1a) of the canonical PGC-1 α -a mRNA isoform. An alternative promoter, located 14 kb upstream of the proximal promoter, allows the transcription of two different first exons (1b and 1b') associated to PGC-1 α -b and PGC-1 α -c alternative transcripts respectively. PGC-1 α -a, PGC-1 α -b and PGC-1 α -c share the same sequence from the second exon to the 13th exon, however, PGC-1 α -b and -1 α -c expression is much lower than PGC-1 α -a in murine skeletal muscle (Chinsomboon et al., 2009; Tadaishi et al., 2011). Lin et al. (2014) have shown that PGC-1 α -a overexpression in C2C12 myoblasts promoted the formation of enlarged myotubes. In contrast, the decreased of PGC-1 α expression mediated by siRNA led to no myotube formation. In addition, Baar et al. (2002) show an additional smaller form of PGC-1 α , at ~34 kDa, in skeletal muscle. Zhang et al. (2009) demonstrated the existence of an alternative splicing between the exons 6 and 7 leading to a 31-bp insertion which generates a new exon called 6' containing a premature stop codon. This exon 6' contains a stop-codon and encodes an N-truncated (NT) isoform of PGC-1 α (Zhang et al., 2009). Transcription of the truncated forms can occur from both the proximal (1a) and alternative (1b) promoters controlling the expression of NT-PGC-1 α and PGC-1 α 4 respectively (Chang et al., 2012; Ruas et al., 2012). Ruas et al. (2012) showed that the overexpression of PGC-1 α 4 in mouse gives rise to a hypermuscular phenotype associated with a decrease of myostatin expression and an increase of IGF-1 expression. In 2014, Wen et al. observed that muscle expresses PGC-1 α 4 upon exercise and clenbuterol stimulation. They also showed that NT-PGC-1 α transcript is able to induce IGF-1 expression and reduce myostatin in C2C12 cells. Moreover, they showed that exercise training promotes preferentially PGC-1 α 4 isoform. Taken together, if the nomenclature is rather confusing, different murine PGC-1 α splice variants have been reported in skeletal muscle, influencing muscle homeostasis and growth (Baar et al., 2002; Chinsomboon et al., 2009; Yoshioka et al., 2009; Norrbom et al., 2011).

This study aims at investigating the presence and the structure of alternative transcripts of the bovine PGC-1 α gene and to determine their effects during myogenesis. We highlighted four transcripts, named PGC-1 α -a, PGC-1 α -b, NT-PGC-1 α and PGC-1 α 4. In basal conditions, our results showed that the truncated forms are the most expressed in bovine muscle. In addition, the transcripts derived from the proximal promoter are predominant, suggesting that NT-PGC-1 α would be the main form. Finally, we showed that the overexpression of both full-length or truncated isoforms of bovine PGC-1 α enhances myoblasts differentiation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Ten 20 month-old Blonde d'Aquitaine bulls were selected randomly for our study. They were reared in the same conditions of feeding, housing and health status. Samples from muscles: *longus colli* (LC), *longissimus thoracis* (LT), *rectus abdominis* (RA), *semitendinosus* (ST), diaphragm, heart and organs: liver, kidney, lung and thymus were collected within 20 min after slaughter, cut into pieces and frozen in liquid nitrogen for the transport to our laboratory. Then, the samples are stored at -80°C for further experimentations.

2.2. C2C12 culture

Murine skeletal C2C12 myoblasts (ATCC) were grown in proliferation medium (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biowest) and 1% penicillin-streptomycin (v/v) (Invitrogen). To induce differentiation into myotubes, at 80% of cell confluency, the medium was replaced by differentiation medium (2% horse serum and 1% penicillin-streptomycin (v/v)). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and medium was changed every two days. After 96 h of differentiation, cells were fixed for immunostaining or collected as pellet for total RNA extractions.

2.3. RNA extraction

Total RNA were extracted from 50 mg of homogenized tissues under liquid nitrogen. Tissues were mixed with 1 mL of TRIzol reagent (Sigma). RNAs were separated from protein and DNA by addition of 200 μL of chloroform and precipitated in 1 mL of isopropanol. After two 70% ethanol washes, the RNA pellets were resuspended in 20 μL of DNase/RNase free water. For C2C12 cells, total RNA was extracted using the RNeasy minikit (Qiagen). The quantity of RNA extracted from tissues or cells was determined using a Nanodrop 2000. RNAs were stored at -80°C until use.

2.4. Retrotranscription, PCR and qPCR

Synthesis of cDNA was performed with 1 μg of total RNA using oligo dT in a total volume of 20 μL either with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied) for RT-qPCR or the Super Script III Reverse Transcriptase (ThermoFisher) for standard PCR.

To identify the full-length variants of PGC-1 α (PGC-1 α -a and PGC-1 α -b), a single PCR reaction was carried out using 75 ng in a 50 μL reaction volume containing 5 μL of $10\times$ PCR buffer, 500 μM of each deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 50 pmol of the forward primer, 50 pmol of the reverse primer (Fig. 1B, Table 1), 0.75 μL of enzyme mix (Expand Long Template PCR System, Roche). PCR is conducted with an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 15 s, 58°C for 30 s and extension at 68°C for 3 min, with a final extension at 68°C for 7 min followed by a 4°C soak.

To identify the truncated variants of the bovine PGC-1 α gene (NT-PGC-1 α and PGC-1 α 4), a semi nested PCR was carried out. Briefly, 75 ng of cDNA or 1.5 μL of the previous PCR product was added to a tube containing 2.5 μL of $10\times$ PCR buffer, 1.5 mM of MgCl_2 , 0.2 mM of dNTP mix, 50 pmol of the forward primer, 50 pmol of the reverse primer (Fig. 1B, Table 1), 0.1 μL of the Platinum Taq polymerase (Invitrogen) in a 25 μL total volume. PCR is conducted with an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min followed by a 4°C soak.

IGF-1 and PGC-1 α exons expression level were evaluated in triplicate in a total volume of 17.5 μL per reaction containing 50 ng of cDNA, 7.5 pmol of each primer (see Table 1) and 8.75 μL of SYBR Green master mix (ThermoFisher), in myoblasts or bovine muscle respectively. The expression values of PGC-1 α were normalized to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), those of IGF-1 to beta-2-microglobulin (B2M). The amplification efficiency was assessed by the construction of a standard curve derived from 6 dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).

Myostatin and myogenin expressions were assessed in triplicate using 50 ng cDNA. The amplification reactions were performed using 1 μL TaqMan probe (Myostatin Mm03024050_m1, Myogenin Mm00446194), 10 μL of $2\times$ Master Mix in a final volume of 20 μL (Applied Biosystem). The expression values in cells were normalized to B2M (B2M Mm00437762, Applied Biosystem).

A.

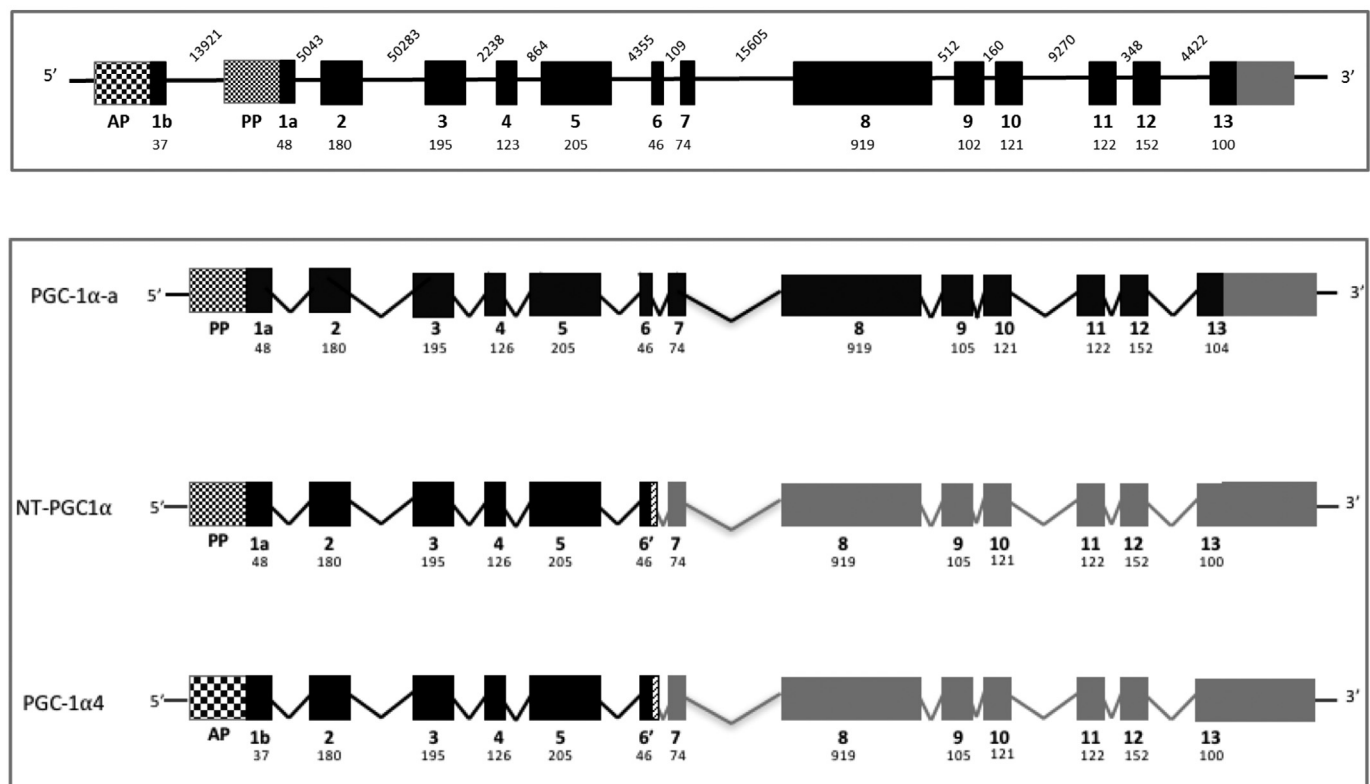


Fig. 1. Murine PGC1-α structure and sequence alignment of mouse and bovine PGC1-α gene. A. The upper part represents the murine PGC1-α gene structure, located on chromosome 5 (MMU5). The lower part shows the three major alternative transcripts of the PGC1-α gene reported in murine skeletal muscle (non-mature transcripts): PGC-1α-a (ENSMUST00000132734.7 - NM_008904); NT-PGC1α (ENSMUST0000031059.13) and PGC-1α4 (ENSMUST00000151104.7 - NR_132764). Exons are represented by boxes; the coding region is colored in black and the non-coding region in grey. The exon number is indicated below the box. The length in base pairs of each exon is indicated below the exon number. The size of the introns is indicated above the line. PP: proximal promoter; AP: alternative promoter. B. Alignment of mouse (MMU) and bovine (BOS) PGC1-α genomic sequence and location of primers used to detect bovine alternative transcripts. Exons sequence is represented in bold. The exon number is indicated above the sequence. The solid line corresponds to the murine sequence. The broken line corresponds to the bovine sequence. Primers location is represented by arrows and highlighted in grey. Double slashes represent part of missing sequence.

2.5. Plasmid constructs

Bovine PGC-1α-a, NT-PGC-1α, PGC-1α4 variants (bPGC-1α-a, bPGC-1α4, bNT-PGC-1α respectively) and murine PGC-1α-α (mPGC-1α-a) were cloned in an expression vector pcDNA3.1 between the restriction sites *Xba*I and *Bam*HI. The amplification of the cDNA was done using specific primers including restriction sites. (see Table 1). The ligated plasmids were amplified using Top 10 cells (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, ThermoFisher). After an overnight amplification, plasmids were extracted with the EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Sequencing was performed to confirm the sequence of the inserts.

2.6. Generation of C2C12 cell lines overexpressed bovine PGC-1α spliced variants

Mouse C2C12 cells were stably transfected using Lipofectamine 3000 (ThermoFisher) with 1 μg of plasmid (bPGC-1α-a, mPGC-1α-a, bPGC-1α4 or bNT-PGC-1α) following the manufacturer's protocol. Briefly, plasmids were diluted at a final concentration of 1 μg in 250 μL of DMEM containing 10 μL of P3000 Reagent. Two separate dilutions of Lipofectamine 3000 were made: 3.75 μL or 7.5 μL in 125 μL of DMEM. Diluted DNA was added to the two Lipofectamine samples and incubated at room temperature for 15 min. Then, the transfection

complex was added drop-wise onto cells. Clones overexpressing bPGC-1α-a, bPGC-1α4 or bNT-PGC-1α were selected using 500 μg/mL of Neomycin-G418. Medium was changed every day. After 15 days, pools of clones were collected and amplified for further assays.

2.7. Immunostaining

The protocol is optimized for myosin staining in C2C12 cells. Cells were fixed in the culture well in 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with 0.1% Triton X-100-PBS for 30 min at 4 °C. The wells were washed 3 times in phosphate buffered saline (PBS). Cells were saturated for 1 h at room temperature using PBS with 20% goat serum. Then, the cells were stained with the primary antibody 1:500e in PBS-BSA 4% (Anti-MyHC Class II antibody, Abcam) overnight in a humid atmosphere at 4 °C. Cells were washed 3 times for 5 min with 0.01% Tween 20-PBS. Then, cells were incubated with the Alexa-Fluor conjugated secondary antibody (1:1000e) and DAPI (1:1000e) in PBS-BSA 4% for 15 min at 37 °C in a humid atmosphere. Cells were rinsed three times as before. Three drops per well of Permount mounting medium (Fisher) were added and dried cells were observed under microscope.

2.8. Protein extraction and Western blot

Proteins were extracted from 100 mg of ST bovine muscle using

Exon 1b
 MMU *cagaatgagtgacatggatgtt-gggattgtcatcatggattcaattttgaaagtgagt*
 BOS *taaaatgaatgacatgcacotcctaggggttatcatttatggactcaatttgaaagtgagt*
 ..*****.*****.*.*.***.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.
 Ex1b-F
 MMU *aaccggaggcattctctccacacctcagaccca//ttggagttgaaaaagcttgactggcgt*
 BOS *atggagagacatggtctctgc-----cccca//ttggagttgaaacagcttgattggcgt*
 ..***.*.***.*.***.*.***.//*****.*.*****.*.*****.*.
 Exon 1a
 Ex1a-F
 MMU *cattcgggagctggatggcttgggacatgtgacgcaagaactctgtatggagtgaacatag*
 BOS *cattcaggagctggatggcgtgggacatgtgcaaccaggactctgtatggagtgaacatcg*
 *****.*****.*.***.*.*****.*.*****.*.*****.*.
 Exon 6
 MMU *gocaaaccaacaactttatctcttctctgtgaccccagagtcaccaaagtaagtaattaaga*
 BOS *gocaaaccaacaactttatctcttctctgtgaccccagagtcaccaaagtaagtaattaaga*
 *****.
 MMU *aatgcaagcattttcagaaagggaagggggttctaatacatttggtctacagcaactccat*
 BOS *aatgtaaccattttcagaaagggaagggggttctaatacatttggtctacagcaactccat*
 *****.*.
 Exon 6'
 Exon 7
 MMU *ttcagtttggtttttataaatgtgccatatcttccagtgaccccaagggttccccatttga*
 BOS *ttcagtttggtttttataaatgtgccatatcttccagtgaccccaagggttccccatttga*
 *****.
 int6-R
 ex6'R
 MMU *gaacaagactattgagcgaaccttaag//tttctttcagataccaactcagagcattttgac*
 BOS *gaacaagactattgaacgaaccttaag//tttctttcagatccaattcagatgaotttgac*
 *****.*.*****.//*****.*.*.*****.*.*.*****.*.
 Exon 13
 MMU *cotgottccaacagagcaagtatgactctctggattttgatagtttaactgaaggagcgt*
 BOS *cotgottgcatcaagagcaagtatgactctctggatttogatagtttaactgaaggagcgt*
 *****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.
 MMU *cagagaagcttgogcagggttaacgtgttcccaggctgaggaaatgacagagagatggtcaat*
 BOS *cagagaagcttaocgagggttaaatgttccctggctaagg-atgacagaggcatggtgaat*
 *****.*.*****.*.*****.*.***.*.***.*.*****.*.*****.*.
 MMU *acctcatgggacagcgtgtccttt/tctctctctctctctctctctctctctctctctctct*
 BOS *acctcacgggacagcgcgtccttt/tctcttttctctctctctctctctctctctctctct*
 *****.*.*****.*.*****.//*****.*.***.*.***.*.*.*****.*.***.*.
 MMU *ctctctccctccctctcttggcattgaatctgggtgggagaggatactgcaggcaccaga*
 BOS *-----tttgccaaggaatctgggtgggagaggatgctgcaaggcaccga*
 *****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.
 MMU *tgtctaaactttcctaacattttgaagttctgtagtttgtcctttgtcctgacacctatg*
 BOS *tgtctaaactttcctaacattttgaagttctgtagtttgtcctctcctgacacctatg*
 *****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.*****.*.***.*.
 3'UTR-R

15

Table 1
Primer sequences for cDNA amplification, RT-qPCR and cloning.

Name	Gene/variant	Sequence
ex1a-F	PGC-1α-a/NT- PGC1α	GCTTGATTGGCGTCATTCA
ex1b-F	PGC-1α4/PGC-1α-b	GACATGCATCCTAGGGGTATCA
ex6'-R	NT-PGC1α/PGC-1α4	TATGGCACATTATATAAAACAAA
ex6-F	NT-PGC1α/PGC-1α4	CTCTCTCTCTGACCCAGAGTCA
3'UTR-R	PGC-1α-a/PGC-1α-b	AGGAAAGTTGAGCATTCGGTGCC
int6-F	NT-PGC1α/PGC-1α4	ATGTGCCATATCTTCCAG
int6-R	NT-PGC1α/PGC-1α4	CTGGAAGATATGGCACAT
Ex2-R	PGC-1α	TTGGTCACTGCACCACTTGAGTCCACCCAG
ex1b-Bam	PGC-1α4	TATGGATCCATGGACTCAGTTCTGAAA
ex1a-Bam	NT-PGC1α/PGC-1α- a	TATGGATCCATGGCGTGGGACATGTGC
ex6'-XbaI	NT-PGC1α/PGC-1α4	TATCTAGATTATATAAAACAAATTGGTGAC
ex3-XbaI	PGC-1α-a	ATTCTAGATTACCTGCGTAAGCTTCT
B2M F	B2M	GGTCTTTCTGGTGCTTGTCTCA
B2M R	B2M	GTTCGGCTTCCCATTTCTCC

200 µL of RIPA Lysis and Extraction Buffer (ThermoFisher). Proteins were quantified at A595nm using the Bradford assay (Bio-Rad). Equal amounts of proteins (50 µg) were resolved on SDS-polyacrylamide gels (10% gradient) and transferred onto 0.2 µm nitrocellulose membranes. Then, membranes were blocked using 5% BSA (w/v) in TBST0.1% buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4, 0.1% Tween-20) for 2 h at room temperature, followed by incubation with specific primary antibodies overnight at 4 °C. The following primary antibodies were used for immunoblotting: 1:2500 dilution of anti-PGC-1α mouse mAb (4C1.3, Merck Millipore) and 1:1000 dilution of anti-GAPDH (AF5718, R&D Systems). After four washes in TBST0.1%, membranes were incubated for 1 h at room temperature with 1:1000 dilution of secondary antibodies: anti-mouse IgG HRP conjugate (P0447, Dako) or anti-rabbit HRP conjugate (P0399, Dako). After four more washes in TBST0.1%, immunoblots were developed by enhanced chemiluminescence.

2.9. Sequencing

The sequencing was performed using ABI 3130 automated sequencer (Applied Biosystems), and carried out on 20 µL of total reaction mix containing 50 ng of clean PCR product or 300 ng of plasmid and 10 pmol of primer (BigDye™ Terminator 3.1). The sequences were purified using Sephadex-G20. The sequence chromatogram was analyzed using the Finch TV program.

3. Results

3.1. Characterization of bovine PGC1-α transcripts

It has been shown that the murine PGC-1α gene is subject to alternative splicing and its transcription is driven by two distinct promoter regions, leading to five different transcripts, three of which are mainly expressed in skeletal muscle (Popov et al., 2015) (Fig. 1A). To characterize the bovine PGC-1α mRNA in tissue, we designed a set of primers after DNA sequence alignment (mouse versus bovine) (Fig. 1B, Table 1). Using RT-PCR, the full-length PGC-1α-a transcript was amplified in skeletal muscle, heart, liver and kidney with the *ex1a-F*/3'UTR-R couple of primers, with an expected size of about 3200 pb (Figs. 1B, 2A). To search for the presence of the PGC-1α-b isoform that contains the exon1b from the alternative promoter, we used the primers *exon1b-F*/3'UTR-R in the same tissue (Figs. 1B, 2A). We revealed these transcripts in skeletal muscle, heart, liver and kidney, demonstrating the use of both the proximal and the alternative promoter. To detect the truncated forms of PGC-1α (NT-PGC-1α and PGC-1α4) characterized by the presence of the exon6' in the mRNA, we performed semi-nested-RT-PCR assays using 3' internal primers designed according to each alternative transcript nucleotide sequence. Using *ex1a-F*/int6-R and then

ex1a-F/ex6'-R couple of primers, an amplicon of ~850 pb was observed in skeletal and cardiac muscle, liver, kidney, lung, thymus and brain, corresponding to NT-PGC-1α. We also found the PGC-1α4 transcript in skeletal and cardiac muscle, liver, kidney, lung and brain using the same previous 3' primers combined with the *ex1b-F* primer (Figs. 1B, 2A). All our results were assessed by sequencing.

To determine if these different transcripts encode proteins, Western blotting using an antibody raised against the endogenous forms of murine PGC-1α were performed. A single band of ~100 kDa was specifically detected in the *longissimus thoracis* muscle of cattle, representing the non-truncated PGC-1α protein. However, no specific band of the truncated isoforms was observed at ~35–38 kDa (Fig. 2B).

3.2. Expression of bovine PGC-1α isoforms in muscle

To evaluate the expression of the full-length PGC-1α-a and the truncated forms PGC-1α4/NT-PGC-1α in bovine muscles (LC, LT, RA, ST, diaphragm, heart), we designed primers targeting independently the exons 1a, 1b, 6' or 13 (see Table 1). The exon1a, transcribed from the proximal promoter, captures the NT-PGC-1α mRNA and the full-length PGC-1α-a whereas the exon1b, transcribed from the alternative promoter, catches the beginning of the PGC-1α4 and the PGC-1α-b isoforms. Furthermore, the full-length form is represented by the expression of the 13th exon whereas the truncated form is revealed by the expression of the exon6'. For expression comparisons, the non-truncated PGC-1α (exon13) was subtracted from the truncated PGC-1α (ex 6') and PGC-1α-ex1b was subtracted from PGC-1α-ex1a. In all muscles, the PGC-1α-ex6' expression was much greater than the PGC-1α-ex13 (3 to 7-fold), demonstrating the truncated transcripts are the main forms (Fig. 3A). Comparison of the expression from the alternative and the proximal promoter (PGC-1α-ex1b – PGC-1α-ex1a) revealed that the majority of PGC-1α expression derived from the exon1a (Fig. 3B). LC, RA, cardiac muscles and diaphragm expressed the exon1a ~50, 90, 75, 65-fold respectively more than the exon1b whereas LT and ST muscles showed a 25-fold change expression. In addition, we revealed transcripts distribution changes between muscles. Compared to the expression in ST muscle, all exons are more expressed regardless of muscle, except the exon1b in the RA. Furthermore, the exons expression is higher in heart and diaphragm than in skeletal muscles. In general, the expression is weaker in the RA muscle (Fig. 3C, D, E, F).

3.3. Bovine PGC-1α transcripts promote myoblast fusion and differentiation

To confirm a potential role of bovine PGC-1α transcripts during myogenesis, we transfected C2C12 cells with a pcDNA3.1 vector containing the cDNA sequence of bovine bPGC-1α-a, bNT-PGC-1α, and bPGC-1α4. The murine PGC-1α-a and an empty plasmid pcDNA3.1 served as controls. At 96 h of differentiation, myoblasts overexpressing these different bPGC-1α isoforms showed a substantial increase in fusion index, 3-fold for bPGC-1α-a and 1.5-fold for bNT-PGC-1α or bPGC-1α4 (Fig. 4A, B). Cells overexpressing bPGC-1α-a presented a significant increase in myotube area at 96 h compared to the empty control. No difference in myotube surface was observed for the truncated isoforms (Fig. 4C). Myotubes expressing independently the different PGC-1α forms appear larger than control (Fig. 4D). In addition, the expression of myogenin, a late myogenic differentiation marker, was increased during the overexpression of these isoforms except for the bNT-PGC-1α (Fig. 4E). We revealed that the mPGC-1α-a overexpression leads to an increase of the fusion index, myotube area, width, and myogenin expression. In addition, we measured at 96 h of differentiation the expression level of myostatin and IGF-1, an atrophic and a hypertrophic myomarker respectively. As expected, cells overexpressing the isoforms showed a decrease in myostatin expression (Fig. 5A). IGF-1 expression is increased in myotubes overexpressing any isoform except bNT-PGC-1α (Fig. 5B).

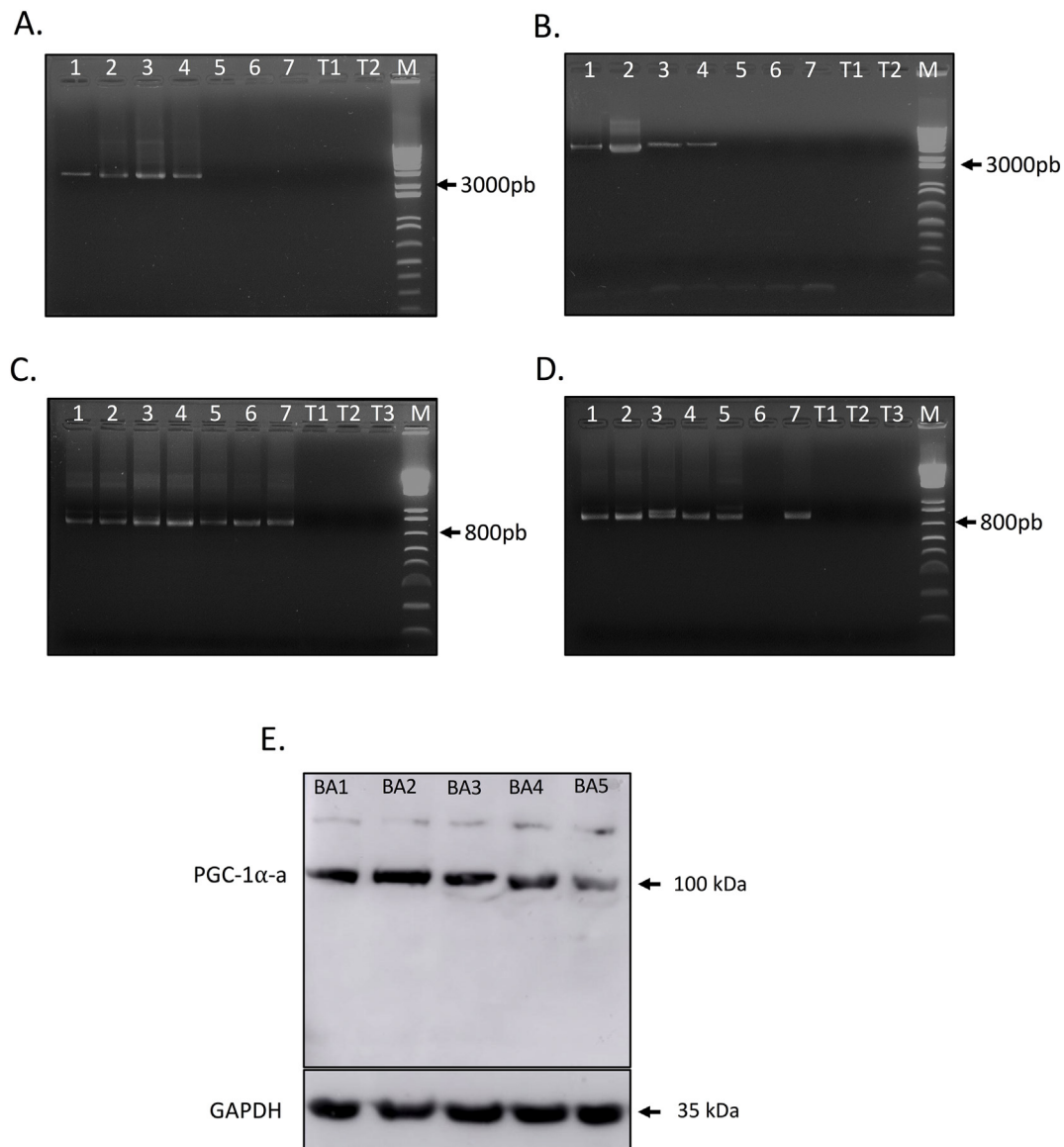


Fig. 2. Characterization of bovine PGC1-α transcripts. A. The full-length PGC1-α-a transcript was amplified with the *ex1a-F/3'UTR-R* couple of primers, with an expected size of about 3200 pb. B. To search for the presence of the PGC1-α-b isoform that contains the exon1b from the alternative promoter, we used the primers *exon1b-F/3'UTR-R*. C–D. To detect the truncated forms of PGC1-α (NT-PGC1-α and PGC1-α4) characterized by the presence of the exon6' in the mRNA, we performed semi-nested-RT-PCR assays using 3' internal primers designed according to each alternative transcript nucleotide sequence. C. Using *ex1a-F/int6-R* and then *ex1a-F/ex6'-R* couple of primers, an amplicon of ~850 pb was observed corresponding to NT-PGC1-α. D. We also found the PGC1-α4 transcript using the same previous 3' primers combined with the *ex1b-F primer*. Results are representative of three experiments. 1: Skeletal muscle; 2: Heart; 3: Liver; 4: Kidney; 5: Lungs; 6: Thymus; 7: Brain; T1: RT assay without ARNs; T2: First PCR assay without sample; T3: Second PCR assay without sample; M: Size Marker. E. Detection of PGC1-α1 protein in bovine skeletal muscle. Total proteins (50 µg) were extracted from ST muscle of 5 Blonde d'Aquitaine animals (BA1–5). PGC1-α-a was detected using a monoclonal antibody against murine PGC1-α. Secondary HRP-anti-mouse IgG was used for visualization with chemiluminescence. GAPDH was blotted as a loading control. Results are representative of three experiments.

4. Discussion

Recent studies reported that multiple mRNAs are produced from the PGC1-α gene by multiple promoter regions and alternative splicing in human/mouse skeletal muscle and brown adipose tissue (Popov et al., 2015). Very little is known about the bovine PGC1-α gene. In literature, bovine PGC1-α was first described in 2005 by Weikard et al. (2005) who showed that PGC1-α is located on chromosome 6. Weikard et al. (2005) reported that PGC1-α is controlled by the proximal promoter and is composed of 13 exons. In this current work, we characterized and investigated the expression of the truncated and non-truncated variants of bovine PGC1-α gene in skeletal muscle. All full-length transcripts detected in our study include 13 exons. We showed that the alternative

promoter (exon1b) and the proximal promoter (exon1a) are used in cattle. Both truncated and non-truncated variants were expressed in different skeletal muscles as well as in heart, liver, brain, thymus and lung. Given the complex structure of the gene and its transcripts, it is not possible to establish independent expression level quantification of each isoform (Lundberg et al., 2014). Therefore, we have quantified by discriminating the non-truncated from the truncated forms as well as the presence of exon1a (proximal promoter) from exon1b (alternative promoter). In basal conditions, our results showed that the truncated forms are the most expressed in bovine muscle. In addition, the transcripts derived from the proximal promoter are predominant, suggesting that NT-PGC1-α would be the main form. Previous studies have shown that the basal expression of exon1b in human/mouse skeletal

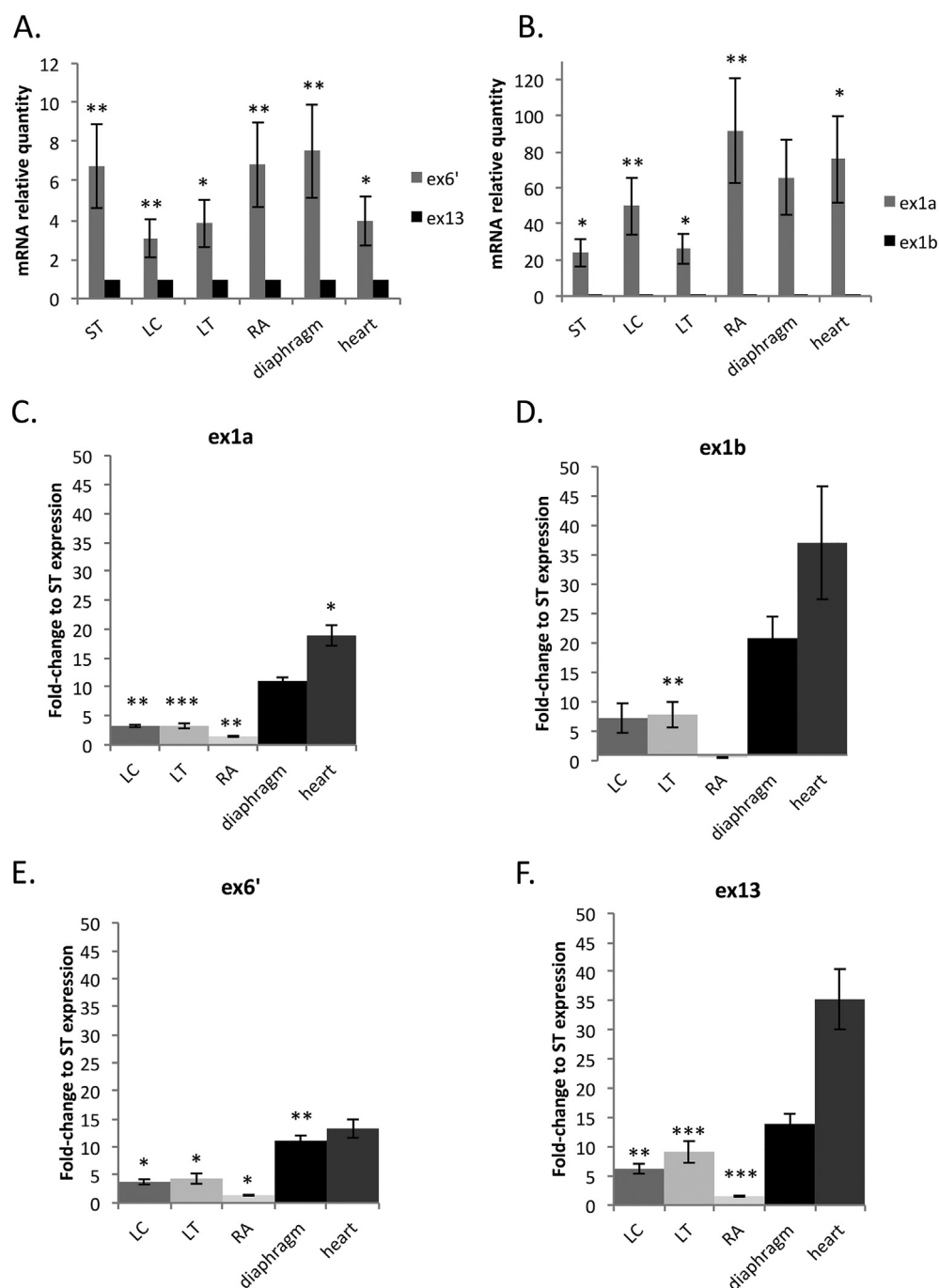


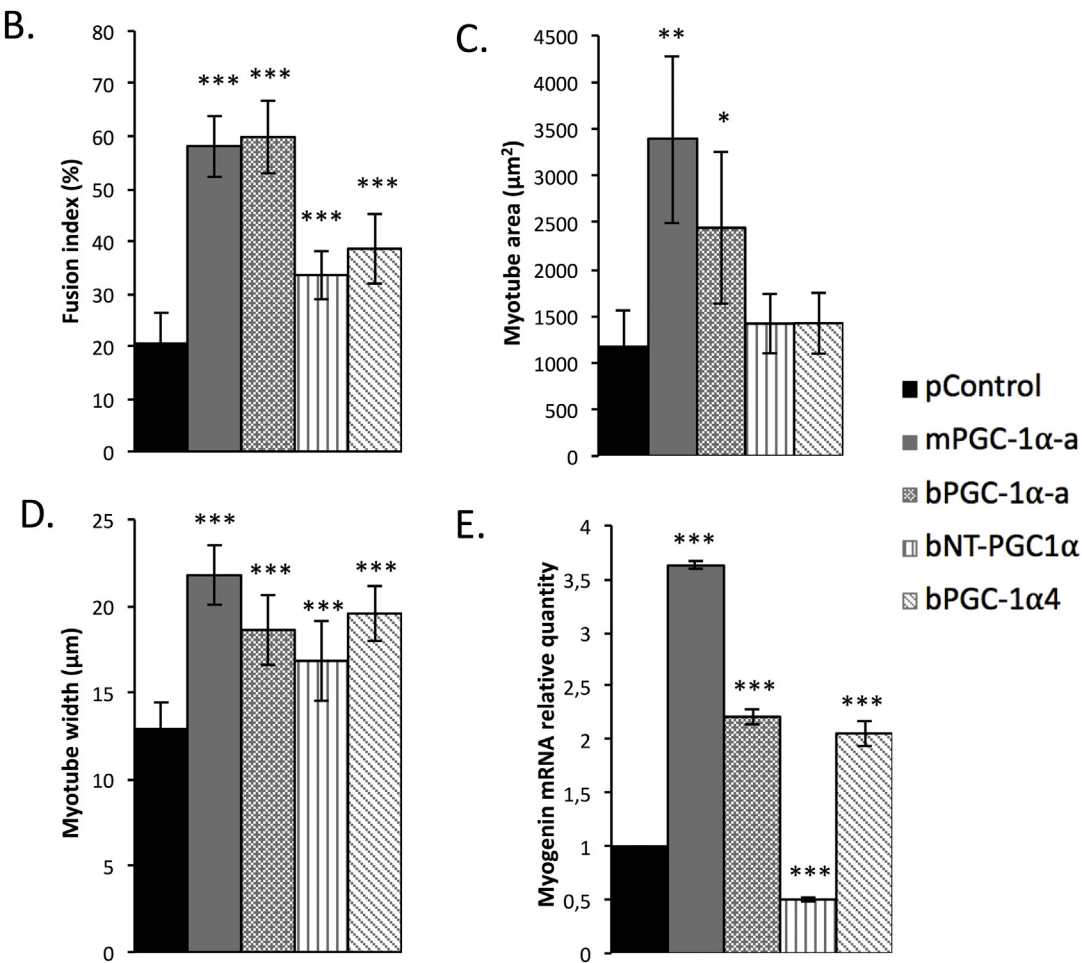
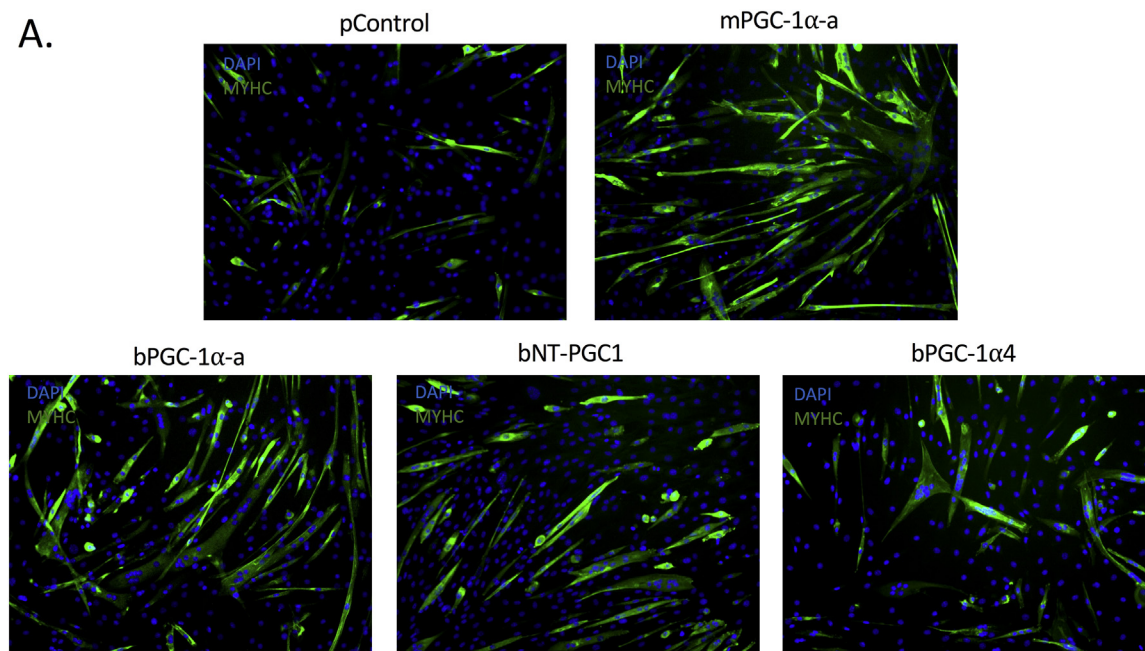
Fig. 3. Expression of bovine PGC-1 α isoforms in muscle. Quantitative real-time PCR analysis performed on total RNA (0.5 μ g/sample) isolated from ST, LC, LT, LT, diaphragm and cardiac muscles of 10 Blonde d'Aquitaine animals. A. Histogram showing expression level of exon6' relative to exon13 expression for each muscle. B. Histogram showing expression level of exon1b relative to exon1a expression for each muscle. C–F. Histograms showing relative PGC-1 α exons expression compare to ST in each muscle. mRNA levels of each exon were normalized to the expression of GAPDH. Each value is the mean $\pm$ SEM of three experiments. Statistical significance was determined using an ANOVA analysis *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. LC: longus colli; LT: longissimus thoracis; RA: rectus abdominis; ST: semitendinosus; ex6': exon6'; ex13: exon13; ex1a: exon1a; ex1b: exon1b.

muscle was very low compared to the one of exon1a. Further, exon1b expression is largely elevated by low-to-high endurance exercise (Norrbon et al., 2011; Wen et al., 2014). Using an antibody recognizing the first 120 amino acids of the murine protein, we detected the full-length protein (~100 kDa) in bovine skeletal muscle. As Barone et al. (2016), we were not able to reveal the truncated forms. However, the truncated proteins have been reported in studies based on specific physiological conditions, i.e. tissues exposed to cold (Zhang et al., 2009).

To investigate the effect of these bovine isoforms, we overexpressed them in C2C12 myoblasts. We found that both bovine PGC-1 α -a or PGC-1 α -4 overexpression as well as the murine PGC-1 α -a enhance myoblast differentiation associated to an increase of the fusion index, myogenin and IGF-1 expression level and a decrease of myostatin expression. We observed the same hypertrophic effect in fusion with the

bovine NT-PGC-1 α overexpression, except the increase of IGF-1 expression. Interestingly, no hypertrophy was observed when the overexpression of the murine full-length PGC-1 α -a was carried out in differentiated primary myotubes (Ruas et al., 2012). The difference in the cell system used (myoblasts versus differentiated myotubes) suggests that PGC-1 α -a would improve myotube hypertrophy in fusion. The absence of myotube formation after PGC-1 α knockdown in C2C12 reinforced this conclusion (Lin et al., 2014). Furthermore, if the muscle-specific overexpression of PGC-1 α -a in the transgenic MCK-PGC-1 α mice seems not lead to an effect of PGC-1 α on muscle differentiation, denervation and fasting caused a much smaller decrease in myofiber diameter (Sandri et al., 2006). More recently, Cannavino et al. (2014) show that these MCK-PGC-1 α mice are protected against the disuse muscle atrophy.

Altogether, we showed that all studied PGC-1 α isoforms in cattle



(caption on next page)

Fig. 4. Bovine PGC-1 α transcripts promote C2C12 myotubes hypertrophy. A. Immunostaining of C2C12 myotubes overexpressing pControl, mPGC-1 α -a, bPGC-1 α -a, bNT-PGC-1 α and bPGC-1 α 4 at 96 h of differentiation. Green: myosin heavy chain; Blue: DAPI. Magnification: $\times 10$. B. Fusion indexes quantification; C. Surface quantification and D. Width quantification of C2C12 overexpressing pControl, mPGC-1 α -a, bPGC-1 α -a, bNT-PGC-1 α , bPGC-1 α 4 at 96 h of differentiation. The ImageJ software was used to assess index fusion (ratio of the number of nuclei in myotubes to the total number of nuclei), myotubes surface and width of 10 randomly chosen fields. E. Myogenin expression in C2C12 overexpressing pControl, mPGC-1 α -a, bPGC-1 α -a, bNT-PGC-1 α , bPGC-1 α 4 at 96 h of differentiation. Each histogram corresponds to the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using a ANOVA analysis. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

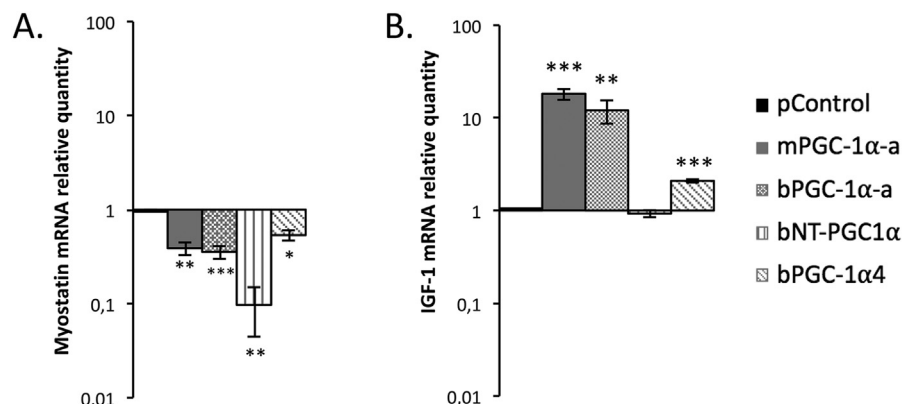


Fig. 5. Myostatin and IGF-1 expression in C2C12 myotubes overexpressing bovine PGC-1 α transcripts. A–B. Myostatin and IGF-1 expression in C2C12 overexpressing pControl, mPGC-1 α -a, bPGC-1 α -a, bNT-PGC-1 α , bPGC-1 α 4 at 96 h of differentiation. Each histogram corresponds to the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments. Statistical significance was determined using a ANOVA analysis. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$.

has a positive effect on myoblast fusion and myotube formation by modulating myostatin and IGF-1 expression. Currently, we are developing primary bovine cultures to go deeper in molecular mechanisms that can explain the variability in muscular phenotypes between different cattle breeds.

In conclusion, our finding provides the first data about the bovine alternative transcripts PGC-1 α gene. The multiplicity of isoforms resulting from PGC-1 α as well as their implication in myogenesis makes PGC-1 α as a gene of interest for the study of the muscular phenotypic variability found in different cattle breeds such as the *Blonde d'Aquitaine*. One can envision, that if proven strong modulators of muscle mass, the bovine PGC-1 α isoforms could be used to engineer future breeds with higher muscularity.

Acknowledgments

This project was co-financed by the European Union, the Limousin Regional Council and the French National Institute for Agricultural Research. JB and AP were supported by a PhD fellowship from INRA/Region Limousin. We thank Mrs. S. Brouard and Mr. A. Delpuch from the French Livestock Institute (Idele) for access to bovine samples.

Conflict of interest

The authors have declared that no competing interests exist.

References

- Andersson, U., Scarpulla, R.C., 2001. PGC-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3738–3749.
- Baer, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P., Holloszy, J.O., 2002. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1879–1886.
- Barone, R., Macaluso, F., Sangiorgi, C., Campanella, C., Marino Gammazza, A., Moresi, V., Coletti, D., Conway de Macario, E., Macario, A.J., Cappello, F., et al., 2016. Skeletal muscle heat shock protein 60 increases after endurance training and induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α 1 expression. *Sci. Rep.* 6, 19781.
- Calvo, J.A., Daniels, T.G., Wang, X., Paul, A., Lin, J., Spiegelman, B.M., Stevenson, S.C., Rangwala, S.M., 2008. Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J. Appl. Physiol.* 104, 1304–1312.
- Cannavino, J., Brocca, L., Sandri, M., Bottinelli, R., Pellegrino, M.A., 2014. PGC-1 α over-

- expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *J. Physiol.* 592, 4575–4589.
- Chang, J.S., Fernand, V., Zhang, Y., Shin, J., Jun, H.-J., Joshi, Y., Gettys, T.W., 2012. NT-PGC-1 α protein is sufficient to link β 3-adrenergic receptor activation to transcriptional and physiological components of adaptive thermogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 9100.
- Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R.K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G.C., Sawada, N., Raghuram, S., Arany, Z., 2009. The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21401–21406.
- Knutti, D., Kralli, A., 2001. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 360–365.
- Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., Spiegelman, B.M., 2002a. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 β (PGC-1 β), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645–1648.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al., 2002b. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797–801.
- Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B.M., 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 1, 361–370.
- Lin, Y., Zhao, Y., Li, R., Gong, J., Zheng, Y., Wang, Y., 2014. PGC-1 α is associated with C2C12 myoblast differentiation. *Cent. Eur. J. Biol.* 9, 1030–1036.
- Lundberg, T.R., Fernandez-Gonzalo, R., Norrbom, J., Fischer, H., Tesch, P.A., Gustafsson, T., 2014. Truncated splice variant PGC-1 α 4 is not associated with exercise-induced human muscle hypertrophy. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 212, 142–151.
- Miura, S., Kai, Y., Kamei, Y., Ezaki, O., 2008. Isoform-specific increases in murine skeletal muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in response to beta2-adrenergic receptor activation and exercise. *Endocrinology* 149, 4527–4533.
- Mortensen, O.H., Plomgaard, P., Fischer, C.P., Hansen, A.K., Pilegaard, H., Pedersen, B.K., 2007. PGC-1 β is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day vs. once daily on expression of the PGC-1 family. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 103, 1536–1542.
- Norrbom, J., Sällstedt, E.K., Fischer, H., Sundberg, C.J., Rundqvist, H., Gustafsson, T., 2011. Alternative splice variant PGC-1 α -b is strongly induced by exercise in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E1092–E1098.
- Philp, A., Belew, M.Y., Evans, A., Pham, D., Sivia, I., Chen, A., Schenk, S., Baar, K., 2011. The PGC-1 α -related coactivator promotes mitochondrial and myogenic adaptations in C2C12 myotubes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R864–R872.
- Popov, D.V., Lysenko, E.A., Kuzmin, I.V., Vinogradova, V., Grigoriev, A.I., 2015. Regulation of PGC-1 α isoform expression in skeletal muscles. *Acta Nat.* 7, 48–59.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B.M., 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.
- Ruas, J.L., White, J.P., Rao, R.R., Kleiner, S., Brannan, K.T., Harrison, B.C., Greene, N.P., Wu, J., Estall, J.L., Irving, B.A., et al., 2012. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy. *Cell* 151, 1319–1331.
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z.P., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., Spiegelman, B.M., 2006. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 16260–16265.
- Shao, D., Liu, Y., Liu, X., Zhu, L., Cui, Y., Cui, A., Qiao, A., Kong, X., Liu, Y., Chen, Q., et al., 2010. PGC-1 β -regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR α . *Mitochondrion* 10, 516–527.

- Tadaishi, M., Miura, S., Kai, Y., Kano, Y., Oishi, Y., Ezaki, O., 2011. Skeletal muscle-specific expression of PGC-1 α -b, an exercise-responsive isoform, increases exercise capacity and peak oxygen uptake. *PLoS One* 6.
- Weikard, R., Kühn, C., Goldammer, T., Freyer, G., Schwerin, M., 2005. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol. Genomics* 21, 1–13.
- Wen, X., Wu, J., Chang, J.S., Zhang, P., Wang, J., Zhang, Y., Gettys, T.W., Zhang, Y., 2014. Effect of exercise intensity on isoform-specific expressions of NT-PGC-1 α mRNA in mouse skeletal muscle. *Biomed. Res. Int.* 2014, 402175.
- Yoshioka, T., Inagaki, K., Noguchi, T., Sakai, M., Ogawa, W., Hosooka, T., Iguchi, H., Watanabe, E., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., et al., 2009. Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1 α gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 537–543.
- Zhang, Y., Huypens, P., Adamson, A.W., Chang, J.S., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Burk, D., Klein, J., Perwitz, N., et al., 2009. Alternative mRNA splicing produces a novel biologically active short isoform of PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 284, 32813–32826.

Nous avons montré que les formes longues PGC-1 α -a et PGC-1 α -b et les formes tronquées NT-PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -b (PGC-1 α 4) étaient exprimées chez le bovin. En conditions basales, les formes tronquées sont plus exprimées que les formes longues dans le muscle squelettique. De plus, les transcrits dérivants du promoteur proximal sont prédominants. Afin de montrer l'implication de PGC-1 α bovin dans la myogenèse, nous avons établi des lignées cellulaires C2C12 sur-exprimant indépendamment les différents isoformes. La sur-expression de PGC-1 α -a, NT-PGC-1 α et PGC-1 α 4 bovins entraînent une augmentation de la différenciation/fusion des myoblastes (hypertrophie en fusion : augmentation de l'index de fusion associée à une augmentation de la largeur des myotubes). De plus, l'augmentation de l'index de fusion est associée à une augmentation de l'expression de la myogénine.

Malgré les 90% d'homologie des séquences codantes du gène PGC-1 α -a bovin et murin, les séquences d'ARNm de PGC-1 α bovin répertoriées dans les bases de données ne correspondent pas à celles de la souris. Les 90% d'homologie ne sont pas retrouvées dans les séquences introniques du gène bovin et murin. Cependant, la partie de l'intron 6 pouvant être retenue à la suite de l'épissage alternatif conduisant à la rétention des 31 paires de bases et à l'apparition dans la séquence exonique d'un codon stop est conservée chez le bovin. Il est ainsi surprenant de ne pas retrouver les variants tronqués bovins dans les bases de donnée. La région située 14 kb en amont du site d'initiation de la transcription (correspondant au promoteur alternatif contrôlant l'expression de l'exon 1b chez la souris) est également conservée chez le bovin. Cependant, les seules données concernant l'existence de l'exon 1b chez le bovin sont prédictives (Gene, NCBI). Nos travaux ont mis en évidence l'existence de transcrits du gène PGC-1 α dans les tissus bovins provenant de son épissage alternatif et du contrôle de son expression par deux promoteurs différents comme décrits chez la souris.

Chez la souris, la base de données Ensembl! répertorie la forme longue PGC-1 α -a (transcrit 203), ainsi que les formes tronquées NT-PGC-1 α -a (transcrit 201) et NT-PGC-1 α -b (transcrit 204). La base de données décrit d'autres transcrits, le transcrit 202 dont l'expression est contrôlée par le promoteur distal et composé des quatre premiers exons, et le transcrit 205 contrôlé par le promoteur proximal et composé de 11 exons. En revanche, la base de donnée ne fait pas mention du transcrit PGC-1 α -b. La description des transcrits bovins de PGC-1 α est restrictive comparée à la complexité des transcrits murins. En effet, la banque de donnée Ensembl! décrit le gène bovin de PGC-1 α comme étant composé de 14 exons dont l'expression est contrôlée par un promoteur proximal uniquement. Le gène peut être alternativement transcrit pour donner deux ARNm qui diffèrent par leur extrémité 3' : le transcrit 201 et le transcrit 202 composés de 13 et 14 exons respectivement. La base de données NCBI Gene fait mention de transcrits prédictifs numérotés de X1 à X6 (XM_010806009.2 = X1 ; XM_010806011.3 = X2 ;

XM_024993058.1 = X3 ; XM_024993059.1 = X4 ; XM_024993060.1 = X5 ; XM_015471552.2 = X6). La découverte de ces transcrits s'inscrit dans un projet soutenu, entre autres, par l'Institut national de l'alimentation et de l'agriculture des Etats-Unis. Ces données d'assemblage de séquences ont été collectées à partir d'échantillon de bovin Hereford. En couplant les séquences des transcrits murins aux séquences prédictives bovines, nous pouvons déduire que le premier exon des transcrits X2 et X4 correspond à l'exon 1b contrôlé par le promoteur distal. Le premier exon du transcrit X1 correspond quant à lui à l'exon 1a. Les transcrits X3 et X5 partagent le même premier exon localisé 400 kb en amont de la séquence de l'exon 1a, non décrit chez la souris. Le premier exon du transcrit prédictif X6 est localisé dans la partie qui correspond à l'intron 1. De plus, les variants X4 et X5 comprennent une rétention de 33 pb dans l'intron 10 (Figure 35), que nous n'avons pas mis en évidence dans nos échantillons musculaires bovins Blonds d'Aquitaine et Limousins.

Ces différents transcrits prédictifs bovin (Gene, NCBI) sont composés de 13 exons ; la séquence du 14^{ème} exon (Ensembl!) étant comprise dans la partie 5'UTR. Chez le bovin, il n'est donc jamais mentionnée de formes tronquées de PGC-1 α , l'intron 6 étant entièrement épissé dans tous les transcrits prédictifs (Gene, NCBI) ainsi que dans les transcrits 201 et 202 (Ensembl !) (Figure 34).

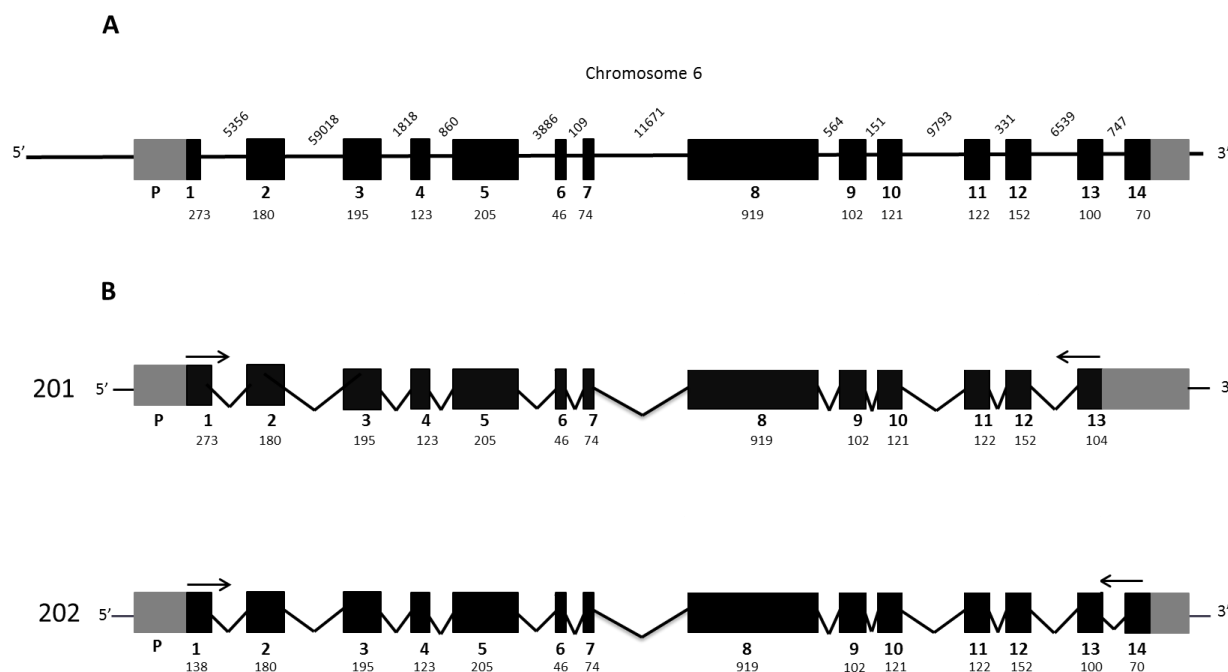


Figure 34 : Structure schématique du gène PGC-1 α chez le bovin. A, locus de PGC-1 α chez le bovin est localisé sur le chromosome 6 brin anti-sens : 44,854,113-44,960,533 (UMD3.1 : GK000006.2). B, transcrits non matures du gène PGC-1 α bovin (201 : brin anti-sens : 44,854,113-44,960,553 (ENSBTAT00000022636.3), 202 : brin anti-sens : 44,855,914-44,960,668 (ENSBTAT00000055094.1)) Les exons sont représentés par les boîtes, les régions codantes sont représentées en noir. Le numéro de l'exon est indiqué en-dessous de la boîte. La longueur en paires de bases de chaque exon est indiquée sous

chaque boîte. La taille des introns est indiquée au-dessus des lignes. Les flèches indiquent le début ou la fin du transcrit.

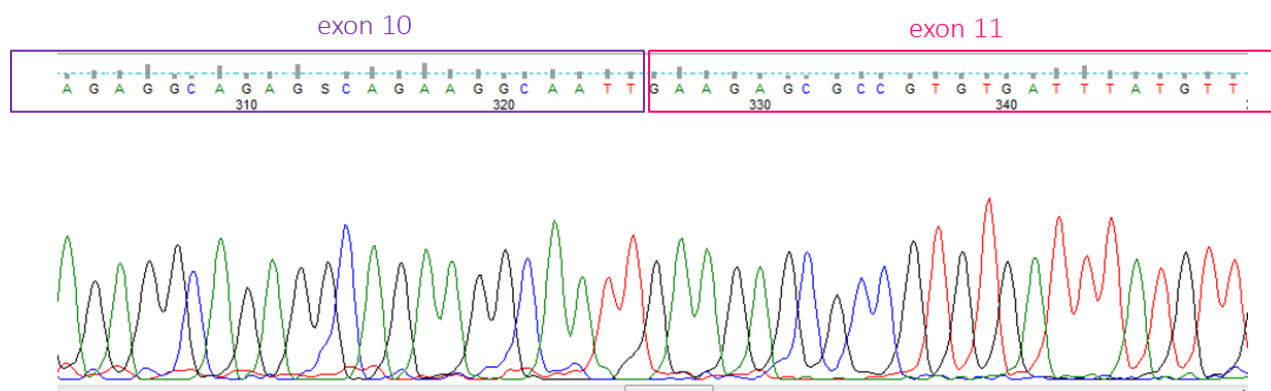


Figure 35 : Séquence nucléotidique de PGC-1 α d'une partie des exons 10 et 11. La partie de l'intron 10 retenue dans l'ARNm mature de PGC-1 α décrite dans la base de données NCBI n'est pas retrouvée dans les séquences obtenues à partir de l'amplification des ARNm de PGC-1 α dans le muscle de Blonde d'Aquitaine.

Nous avons aligné les séquences génomiques bovines et murines de PGC-1 α afin de designer les amorces permettant d'amplifier les différents isoformes en PCR point final. C'est ainsi que nous avons mis en évidence que les formes longues chez le bovin pouvaient être associées aussi bien à l'exon 1a (PGC-1 α -a) qu'à l'exon 1b (PGC-1 α -b). Nous avons aussi démontré que les formes tronquées sont exprimées chez le bovin, associées à l'exon 1a (NT-PGC-1 α -a) ou à l'exon 1b (NT-PGC-1 α -b). Nous avons prouvé que PGC-1 α -a et PGC-1 α -b ainsi que les formes tronquées NT-PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -b (PGC-1 α 4) étaient exprimés dans le muscle squelettique chez la Salers, la Blonde d'Aquitaine et la Limousine, ainsi que dans de multiples tissus chez la Blonde d'Aquitaine et chez la Limousine (Tableau 2).

	Salers	Blonde d'Aquitaine	Limousine
PGC-1 α -a	✓	✓	✓
PGC-1 α -b	✓	✓	✓

	Salers	Blonde d'Aquitaine	Limousine	Charolaise	Angus	Noire Japonaise
NT- PGC-1 α -a	✓	✓	✓	✓	✓	✓
NT-PGC-1 α -b	✓	✓	✓	✓	✓	✓

	Cœur	Foie	Rate	Rein	Thymus	M. épinière	M. osseuse	Poumon	Colon	Cerveau
NT- PGC-1 α -a	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
NT-PGC-1 α -b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tableau 2 : Tableaux récapitulatifs de l'expression des transcrits de PGC-1 α chez le bovin et dans les tissus chez la Limousine.

ANIMAL	DATE NAISSANCE	DESSUS EPAULE	LARGEUR DOS	ARRONDI CULOTTE	LARGEUR CULOTTE	EPAISSEUR DESSUS	LONGUEUR CULOTTE	MUSCLE	LONGUEUR DESSUS	LONGUEUR BASSIN	DEVELOPEMENT	SQUELETTE	POIDS CARCASSE	CLASSEMENT	GRAS
FR8615565283	07/12/2015		7	6	7	6	7	6	66	8	7	7	73	379 U=	2
FR8615565283	07/12/2015		5	5	5	5	4	5	47	8	8	8	80	412 U-	2
FR8615565278	03/12/2015		9	9	8	8	6	6	74	4	4	3	35	414 U=	2
FR8615565277	27/11/2015		7	7	8	6	7	6	69	7	6	6	63	395 U+	2
FR8615105667	21/09/2015		8	7	6	7	4	6	60	8	8	8	80	473 U=	2
FR8615565266	25/11/2015		6	5	5	4	3	4	43	4	4	4	40	403 U=	2
FR8615105653	21/07/2015		8	7	7	7	7	7	71	5	5	5	50	444 U+	2
FR8615105683	29/09/2015		9	8	8	6	8	6	76	5	5	5	50	432 E-	2
FR8615105687	30/09/2015		8	7	8	7	6	6	69	6	5	6	58	396 U=	2
FR8615565266	13/10/2015		8	8	7	7	6	6	69	4	4	4	40	395 U-	2

Tableau 3 : Jeunes bovins Blonds d'Aquitaine testés dans cette étude. Classement E.U.R.O.P. E : carcasses présentant un développement musculaire exceptionnel. U : carcasses présentant un fort développement musculaire.

Nous nous sommes ensuite focalisés sur l'étude des niveaux d'expression des isoformes de PGC-1 α en ciblant les différents exons dans le muscle (le muscle cardiaque et les muscles squelettiques : *longus colli* (LC), *longissimus thoracis* (LT), *rectus abdominis* (RA), *semitendinosus* (ST), diaphragme) chez la Blonde d'Aquitaine. Quel que soit le muscle considéré, nous avons montré que l'exon 1a était plus exprimé que l'exon 1b mais aussi que la forme tronquée, représenté par l'expression de l'exon 6', était plus exprimée que la forme longue. Afin d'expliquer la variabilité de l'expression des différents exons, nous avons élaboré des boîtes à moustaches nous permettant de montrer la distribution des niveaux d'expression des différents exons selon les animaux. Ainsi, nous voyons qu'il y a une grande variabilité d'expression entre les animaux sans qu'elle ne soit liée à leur phénotype (Figure 36). En effet, bien que nous ayons les données des mesures macroscopiques des animaux testés, nous avons un échantillonnage trop faible pour corrélérer l'expression des différents exons au phénotype des animaux (Tableau 3). De plus, les valeurs maximales pour un exon donné ne correspondent pas au même animal selon les muscles considérés.

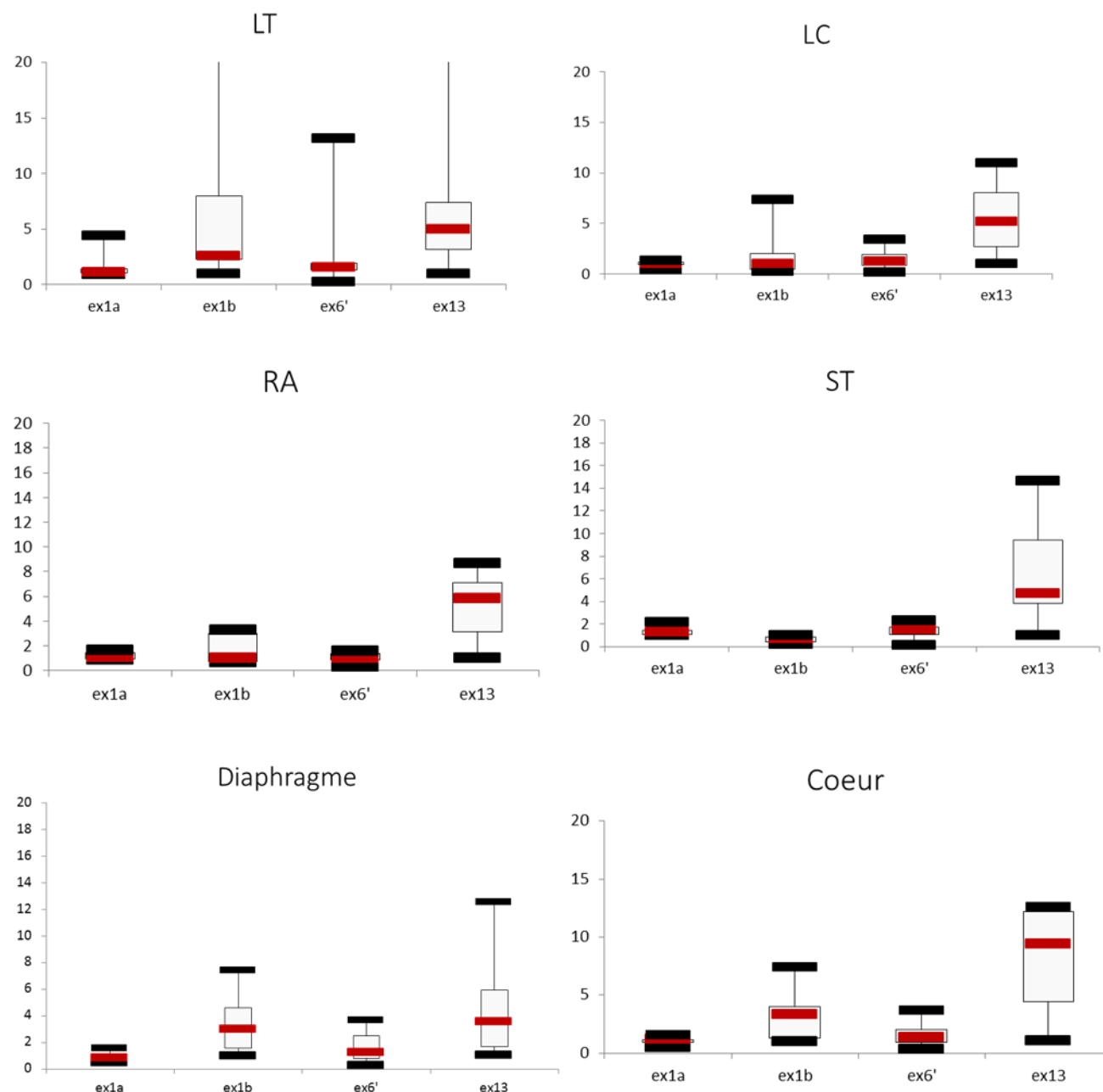


Figure 36 : Boîtes à moustaches illustrant la variabilité de l'expression des différents exons des dix animaux Blonds d'Aquitaine testés. L'expression des différents exons est distribuée en quatre quartiles sur le graphique comme suit : la ligne du bas correspond à la valeur minimale, la ligne du haut correspond à la valeur maximale. La boîte est délimitée en bas par le premier quartile et en haut par le troisième quartile, la ligne rouge correspond à la valeur médiane de l'échantillon. LT : *longissimus thoracis* ; LC : *longissimus colli* ; RA : *rectus abdominis* ; ST : *semitendinosus*.

Après avoir mis en évidence les différents transcrits exprimés chez le bovin, nous avons testé leur implication dans le développement musculaire. Pour ce faire, nous avons transfecté les isoformes murin PGC-1 α -a, et bovins PGC-1 α -a (bPGC-1 α -a), NT-PGC-1 α -a (bNT-PGC1 α), NT-PGC-1 α -a (bPGC-1 α 4) dans les myoblastes C2C12, un modèle cellulaire qui mime les étapes de la myogenèse. Les cellules exprimant le plasmide vide (PCDNA3.1) servent de contrôle (pControl). Nous avons montré, par des études

immunohistochimiques, que la sur-expression des quatre variants mène à une augmentation de l'index de fusion associée à une augmentation de la largeur des myotubes. L'augmentation de l'index de fusion est cohérente avec l'augmentation de l'expression de la myogénine. Les cellules présentent également une diminution de l'expression de la myostatine ainsi qu'une augmentation de l'expression d'IGF-1 à 96h de différenciation. Pour aller plus loin, nous avons quantifié l'expression de Pax7, un marqueur des cellules en prolifération. Dans les cellules en prolifération, l'expression de Pax7 est plus grande dans les cellules sur-exprimant les isoformes de PGC-1 α que dans les cellules contrôle. De plus, en différenciation, les cellules sur-exprimant les isoformes de PGC-1 α ont une diminution moins drastique de Pax7 que les cellules contrôles (Figure 37).

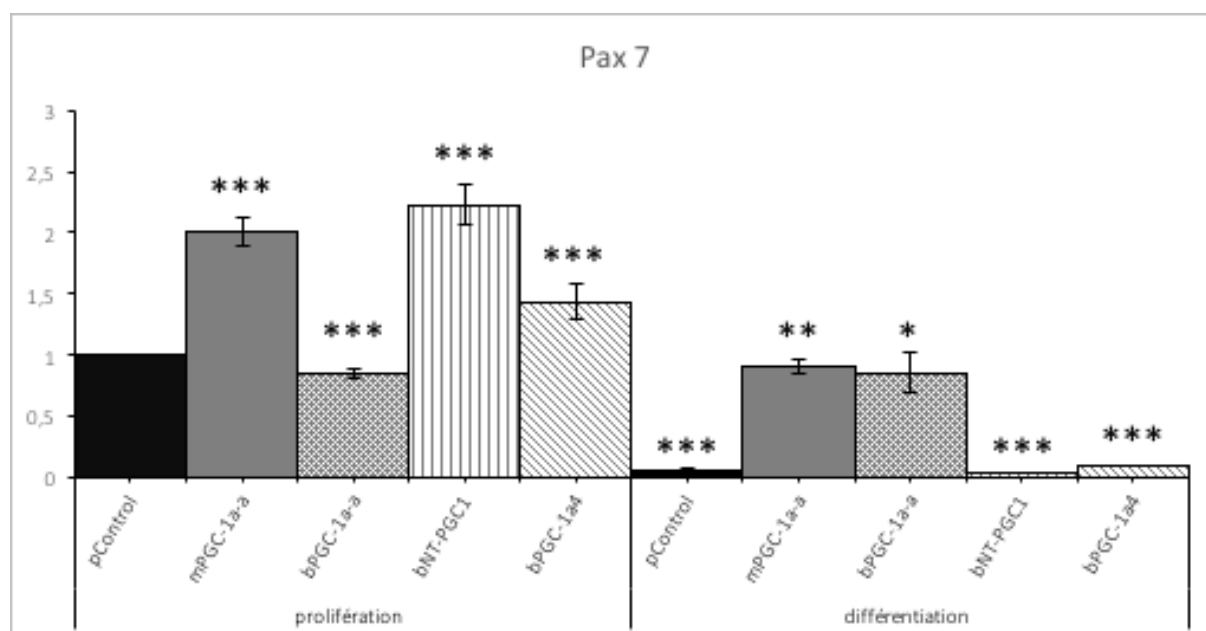


Figure 37 : Expression de Pax7 des C2C12 sur-exprimant pControl, mPGC-1 α 1, bPGC-1 α 1, bNT-PGC-1 α , bPGC-1 α 4 en fin de prolifération et à 96h de différenciation. L'histogramme correspond à la moyenne $\pm$ S.D de trois expériences indépendantes. La significativité statistique a été analysée grâce à un test ANOVA. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.005$.

DISCUSSION

Discussion

Les caractéristiques de production des animaux domestiques, de l'élevage du bétail aux propriétés sensorielles et nutritionnelles de la viande impliquent de nombreux gènes dont l'expression est largement influencée par des facteurs environnementaux. L'élevage des animaux représente un coût important, d'un point de vue monétaire mais aussi environnemental.

C'est la raison pour laquelle la sélection des individus sur des caractères génétiques favorables présente un réel intérêt. Les études portent surtout sur des études *in silico* d'association de SNP (Single-Nucleotide Polymorphism : polymorphisme nucléotidique simple) à des caractères phénotypiques (GWAS : Genome-Wide Association Study) à partir d'échantillons biologiques. Ces GWAS génèrent beaucoup de données sans que toutes puissent être vérifiées expérimentalement. Les études gènes-candidat complètent donc ces informations obtenues *in silico*. Chez le bovin l'étude du gène PGC-1 α est peu étendue bien qu'elle soit cependant prometteuse. En effet, des études de SNP ont montré que le gène PGC-1 α était associé à des caractéristiques bouchères de la viande. Le gène PGC-1 α est situé dans un QTL (Quantitative Trait Loci : locus de caractères quantitatifs) au chromosome 6 associé initialement à la production de lait (rendement et qualité nutritionnelle) (Freyer *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2016; Weikard *et al.*, 2005). Etant impliqué dans le métabolisme des lipides, PGC-1 α a été également étudié dans le but de montrer son rôle dans la modulation des phénotypes de tissu adipeux intramusculaire. Le tissu adipeux intramusculaire est une caractéristique bouchère importante car il module les qualités organoleptiques de la viande. Il a été montré que PGC-1 α , de même que HNF4, est impliqués dans la modulation du persillage de la viande (Ramayo-Caldas *et al.*, 2014; Sevane *et al.*, 2013). Les auteurs précisent cependant que les SNP ne sont peut-être pas des mutations causales. Ces résultats sont en désaccord avec les résultats de l'étude de Shin *et al.* (2013) qui ne trouvent pas de SNP du gène PGC-1 α associés aux caractéristiques du tissu adipeux. Pour un SNP donné, les résultats peuvent être discordants car les fonds génétiques des races sont différents. Des SNP du gène PGC-1 α sont aussi associés à la croissance des bovins. En effet, une mutation silencieuse située dans l'exon 3 (396G>A) du gène PGC-1 α est associée au poids de la carcasse et au gain moyen journalier chez la race bovine allaitante Nanyang (Li *et al.*, 2014). Des études supplémentaires ont montré l'existence de nombreux polymorphismes sur le gène PGC-1 α , dont certains sont associés aux caractéristiques de la carcasse notamment à l'aire du muscle *longissimus dorsi* chez le bovin (Shin and Chung, 2013). Les SNPs dans l'intron 3 (292 C>T) et dans l'intron 5 (1064 C>T) sont également associés aux caractéristiques de la carcasse. En effet, les animaux de génotype CC en position 292 sont plus larges que les animaux de génotype TT chez les bovins Hanwoo (Shin and Chung, 2013).

Dans ces études, le gène PGC-1 α est ainsi montré comme étant impliqué dans le développement musculaire. Chez le bovin, l'hypermusculature conservée chez certains animaux est souvent associée à des mutations dans le gène de la myostatine. Cependant, des mutations sur d'autres gènes, naturelles ou expérimentales, peuvent entraîner des modulations du développement musculaire dans différentes espèces. C'est le cas d'une mutation naturelle (transversion T→A au signal de polyadénylation AATATA) du gène IGF-1 reportée chez l'homme. La mutation induit un dérèglement de l'épissage de l'ARNm d'IGF-1. Né de parents hétérozygotes, l'enfant homozygote pour la mutation présente un important défaut de croissance (Bonapace *et al.*, 2003; Walenkamp *et al.*, 2005). De façon expérimentale, la sur-expression d'IGF-1 conduit à hypertrophie du muscle squelettique chez la souris (Musrò *et al.*, 2001). Dans un contexte musculaire, le gène PGC-1 α a été également étudié de façon expérimentale. L'article de Ruas *et al.* (2012) a mis en lumière l'isoforme PGC-1 α 4 qui est décrit comme entraînant une hypertrophie lors de sa sur-expression et modulant le typage des fibres au profit des fibres de type IIA et IIX. De plus, l'isoforme PGC-1 α 4 entraîne la sous-expression de la myostatine et la sur-expression d'IGF-1.

Dans une approche gène-candidat, les données *in silico* chez le bovin ainsi que les données expérimentales chez l'homme et la souris nous ont menés à l'étude du gène PGC-1 α chez le bovin.

Comme il a été exposé au début de ce manuscrit, les objectifs de mes travaux de thèse ont été de compléter les connaissances sur les différents transcrits de PGC-1 α exprimés chez le bovin ainsi que leurs niveaux d'expression. Nous avons ensuite créé des lignées cellulaires myoblastiques C2C12 sur-exprimant les différents transcrits afin de mettre en évidence leur implication dans le développement musculaire.

Les données de la littérature concernant PGC-1 α sont confuses, en effet, les auteurs sont peu cohérents avec la nomenclature. Par exemple, PGC-1 α 2 de l'étude de Ruas *et al.* (données supplémentaires de l'article de Ruas *et al.*, 2012) ne correspond pas au PGC-1 α 2 de la revue de Popov *et al.* (2015). De plus, les auteurs ne précisent que très peu souvent l'isoforme étudié. Du fait de la position des parties conservées, il est complexe de différencier les isoformes considérés. Les isoformes diffèrent par leur extrémité 5' (exon 1a, 1b et 1c) et par les extrémités 3' (forme tronquée à l'exon 6' ou forme longue). De plus, les exons 1a, 1b ou 1c peuvent être associées aux formes longues ou courtes rendant leur étude d'autant plus difficile. De ce fait, il est quasiment impossible d'évaluer les niveaux d'expression des formes entières des variants de PGC-1 α puisque les techniques de qPCR SyBR Green ou TaqMan ne permettent pas d'amplifier des séquences de plus de 200 pb dans des conditions optimales. En effet, les formes tronquées comprennent environ 850 pb et les formes longues comprennent environ 2500 pb. Les primers désignés pour amplifier des séquences comprises entre l'exon 2 et l'exon 6 ne permettant

donc pas de discriminer les différents isoformes, la précision dans le choix des amorces est alors primordiale. C'est la raison pour laquelle des auteurs font le choix de quantifier les exons un à un (Lundberg *et al.*, 2014; Ydfors *et al.*, 2013), c'est la méthode que nous avons suivie. L'étude des formes entières ne peut être réalisée que par PCR point final mais cette technique n'est pas adaptée à l'étude des niveaux d'expression.

Nous avons confirmé la présence de PGC-1 α -a (201) chez le bovin, ce transcrit est exprimé chez les races bovines testées (Blonde d'Aquitaine, Limousine, Charolaise, Salers, Angus, Noire Japonaise) et dans de multiples tissus chez la Limousine et la Blonde d'Aquitaine (Résultats complémentaires, Tableau 2).

Chez la souris, les études concernant l'utilisation du promoteur alternatif sont discordantes. En effet, la première étude à mettre en évidence le promoteur alternatif dans le muscle squelettique est celle de Miura *et al.* (2008). Une autre étude précise que ce promoteur n'est utilisé que dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux brun (Chinsomboon *et al.*, 2009), or l'étude de Ruas *et al.* (2012) montre que l'isoforme PGC-1 α 4 est exprimé aussi dans le muscle cardiaque, le cerveau, le rein et le tissu adipeux brun révélant l'utilisation du promoteur distal dans ces tissus (Figure 38).

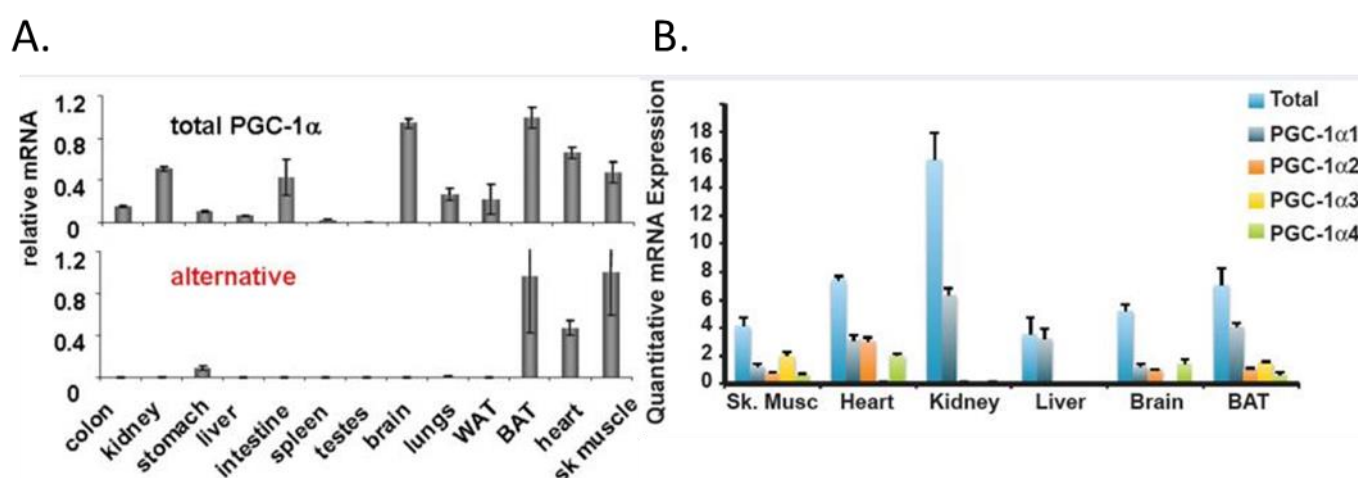


Figure 38 : Profil d'expression des isoformes de PGC-1 α chez la souris selon deux études. A, Distribution tissulaire de tous les isoformes de PGC-1 α (haut) et des isoformes dérivants du promoteur alternatif (bas). Chinsomboon *et al.*, 2009. B, Distribution tissulaire de PGC-1 α 1, PGC-1 α 2, PGC-1 α 3, PGC-1 α 4 (PGC-1 α 2 et PGC-1 α 4 dérivent du promoteur alternatif et contiennent l'exon 1b). Ruas *et al.*, 2012.

Nous avons montré pour la première fois que PGC-1 α 4, NT-PGC-1 α -a et PGC-1 α -b étaient exprimés chez le bovin (Bamba *et al.*, 2018). De même que chez la souris, la séquence de l'exon 1b est située 14 kb en

amont de la séquence de l'exon 1a. Nous avons par ailleurs montré que les transcrits bovins NT-PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -b présentaient 98% d'homologie avec les séquences murines.

L'étude des protéines PGC-1 α est également complexe. En effet, l'anticorps commercialisé pour permettre la détection de PGC-1 α murin ne discrimine pas les exons 1a et 1b. En effet, l'antigène reconnu est constitué des 120 premiers acides aminés, soit les acides aminés codés par les exons 1, 2 et une grande partie de l'exon 3. L'anticorps peut donc se fixer sur les parties codées par les exons 2 et 3 et reconnaître les protéines NT-PGC-1 α -1, PGC-1 α 4, PGC-1 α -a et PGC-1 α -b. La partie de la séquence protéique murine reconnue par l'anticorps partage 97% d'homologie avec la séquence bovine, ceci permet l'utilisation de l'anticorps commercialisé pour l'étude des protéines de PGC-1 α chez le bovin. Chez la souris, les protéines PGC-1 α 4 et NT-PGC-1 α ne sont pas toujours détectées (Barone *et al.*, 2016). Cependant l'étude de Ruas *et al.* (2012) montre que l'anticorps est capable de cibler les formes longues et les formes tronquées de PGC-1 α . De même, l'étude de Zhang *et al.* (2009) montre la détection de NT-PGC-1a dans le foie à la suite d'un jeûne et dans le muscle squelettique soumis à un exercice prolongé. Chez le bovin, nous ne pouvons pas soumettre les animaux à de telles conditions. Nous avons cependant été capable, pour la première fois, de détecter la forme longue PGC-1a- α dans le muscle squelettique bovin.

Dans cette étude, nous avons analysé les niveaux d'expression des exons de PGC-1 α indépendamment plutôt que de quantifier l'expression des formes entières des variants qui est une méthode remise en question à cause de la longueur des ADNc. Chez l'humain et la souris, l'expression de l'exon 1b est plus basse que l'expression de l'exon 1a en conditions basales. A l'exercice, l'expression de l'exon 1a et 1b est augmentée mais l'augmentation de l'exon 1b est plus grande (Norrbon *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2014). Il n'aurait pas été surprenant de ne pas retrouver l'expression de l'exon 1b dans nos échantillons car les animaux d'abattage ne sont pas soumis à l'exercice. Cependant, dans tous les échantillons musculaires testés, nous avons été capable de détecter l'expression de chaque exon. La forme tronquée est aussi plus exprimée que la forme longue ce qui suggère que le transcrit NT-PGC-1 α -a est la forme prédominante. De plus, c'est dans le muscle ST que l'expression des différents exons de PGC-1 α est la plus basse.

Nous avons montré que les isoformes de PGC-1 α étaient exprimés chez le bovin. L'étude de Ruas *et al.*, (2012) montre que les myotubes transduits avec l'isoforme PGC-1 α 4 entraînait une hypertrophie musculaire contrairement à PGC-1 α -a (Figure 39). Nous avons donc voulu répondre à la question : quel(s) isoforme(s) bovin(s) entraînent une hypertrophie ? Dans cette présente étude, nous avons montré que la sur-expression de l'isoforme bovin PGC-1 α 4 entraînait une hypertrophie mais aussi la sur-expression de PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -a ainsi que l'isoforme murin PGC-1 α -a. Il a été montré que l'isoforme murin PGC-1 α -a entraînait une hypertrophie dans les C2C12 associée à une augmentation de MyoD, et de MyoG ainsi qu'une augmentation de MyHC I associée à une diminution de MyHC IIx (Lin *et al.*, 2014). La différence des résultats obtenus entre l'étude Ruas *et al.* (2012) et nos résultats peut provenir de la différence de modèle cellulaire (C2C12/cellules primaires) ainsi que de la méthode de transfection. En effet, dans l'étude de Ruas *et al.* (2012), les myotubes matures sont transduits alors que nous avons établi des lignées stables ou les cellules sur-expriment les différents isoformes dès leur état prolifératif. Dans nos cellules, la sur-expression des isoformes est associée à une augmentation de l'expression d'IGF-1 et à une diminution de l'expression de la myostatine. Ces données sont cohérentes avec les données de la littérature (Ruas *et al.*, 2012). La sur-expression de l'isoforme NT-PGC-1 α entraîne un profil d'expression d'IGF-1 et de la myostatine différent des autres isoformes. En effet, sa sur-expression n'entraîne pas de sur-expression d'IGF-1 mais entraîne une sous-expression de la myostatine plus grande.

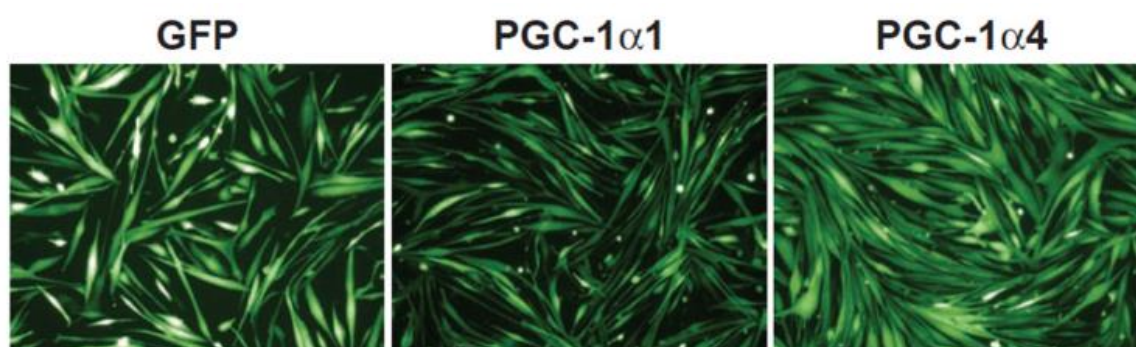


Figure 39 : Les myotubes murins sur-exprimant PGC-1 α 4 montrent une hypertrophie. GFP : Green Fluorescent Protein. Ruas *et al.*, 2012.

Pour conclure, notre étude montre l'implication de différents variants du gène PGC-1 α bovin dans la myogenèse. Nous avons montré que les phénomènes de transcription du gène PGC-1 α bovin étaient plus complexes que sa description dans les bases des données. En effet, le gène PGC-1 α bovin est soumis au contrôle de deux promoteurs et peut être alternativement épissé pour donner les transcrits

longs et tronqués comme ils existent chez l'homme ou chez la souris. PGC-1 α semble être un facteur clé pour expliquer la variabilité phénotypique inter et intra espèces bovines. PGC-1 α pourrait alors être un gène de plus à étudier lors de la sélection des animaux reproducteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Agudelo, L.Z., Femenía, T., Orhan, F., Porsmyr-Palmertz, M., Goiny, M., Martinez-Redondo, V., Correia, J.C., Izadi, M., Bhat, M., Schuppe-Koistinen, I., et al. (2014). Skeletal muscle PGC-1 α modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell* 159, 33–45.

Aguiari, P., Leo, S., Zavan, B., Vindigni, V., Rimessi, A., Bianchi, K., Franzin, C., Cortivo, R., Rossato, M., Vettor, R., et al. (2008). High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1226–1231.

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.

Andersson, U., and Scarpulla, R.C. (2001). PGC-1-Related Coactivator, a Novel, Serum-Inducible Coactivator of Nuclear Respiratory Factor 1-Dependent Transcription in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3738–3749.

Aquilano, K., Vigilanza, P., Baldelli, S., Pagliei, B., Rotilio, G., and Ciriolo, M.R. (2010). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Co-activator 1 α (PGC-1 α) and Sirtuin 1 (SIRT1) Reside in Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 285, 21590–21599.

Arany, Z., Foo, S.-Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M., et al. (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* 451, 1008–1012.

Barone, R., Macaluso, F., Sangiorgi, C., Campanella, C., Marino Gammazza, A., Moresi, V., Coletti, D., Conway de Macario, E., Macario, A.J., Cappello, F., et al. (2016). Skeletal muscle Heat shock protein 60 increases after endurance training and induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α expression. *Sci. Rep.* 6, 19781.

Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., et al. (2008). Skeletal Muscle-Specific Ablation of raptor, but Not of rictor, Causes Metabolic Changes and Results in Muscle Dystrophy. *Cell Metab.* 8, 411–424.

R. Bocard, B. L. Dumont, A. Talmant. CONSÉQUENCES DE L'HYPERTROPHIE MUSCULAIRE HÉRÉDITAIRE DES BOVINS SUR LA MUSCULATURE (1). *Annales de génétique et de sélection animale*, INRA Editions, 1974, 6 (2), pp.177-186. <hal-00892613>

Bodine, S.C. (2006). mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, 1950–1957.

- Bodine, S.C., and Baehr, L.M. (2014). Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 307, E469–E484.
- Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., et al. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* 3, 1014–1019.
- Bogdanovich, S., Krag, T.O.B., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittemore, L.-A., Ahima, R.S., and Khurana, T.S. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420, 418–421.
- Bonapace, G., Concolino, D., Formicola, S., and Strisciuglio, P. (2003). A novel mutation in a patient with insulin-like growth factor 1 (IGF1) deficiency. *J. Med. Genet.* 40, 913–917.
- 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.
- Brooke M.H., Kaiser K.K., Muscle fiber types: how many and what kind?, *Arch. Neurol.* 23(1970) 369–379
- 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.
- Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Melendez, P.A., Oh, B.-C., Lidov, H.G.W., Hasselgren, P.-O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J., et al. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119, 285–298.
- Calvo, J.A., Daniels, T.G., Wang, X., Paul, A., Lin, J., Spiegelman, B.M., Stevenson, S.C., and Rangwala, S.M. (2008). Muscle-specific expression of PPAR γ coactivator-1 α improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J. Appl. Physiol.* 104, 1304–1312.
- Cannavino, J., Brocca, L., Sandri, M., Bottinelli, R., and Pellegrino, M.A. (2014). PGC1- α over-expression prevents metabolic alterations and soleus muscle atrophy in hindlimb unloaded mice. *J. Physiol.* 592, 4575–4589.
- Chang, J.S., Huypens, P., Zhang, Y., Black, C., Kralli, A., and Gettys, T.W. (2010). Regulation of NT-PGC-1 α Subcellular Localization and Function by Protein Kinase A-dependent Modulation of Nuclear Export by CRM1. *J. Biol. Chem.* 285, 18039–18050.
- Chang, J.S., Fernand, V., Zhang, Y., Shin, J., Jun, H.-J., Joshi, Y., and Gettys, T.W. (2012). NT-PGC-1 α Protein Is Sufficient to Link β 3-Adrenergic Receptor Activation to Transcriptional and Physiological Components of Adaptive Thermogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 9100.

- Chang, Y.-F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 51–74.
- Chinsomboon, J., Ruas, J., Gupta, R.K., Thom, R., Shoag, J., Rowe, G.C., Sawada, N., Raghuram, S., and Arany, Z. (2009). The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 21401–21406.
- Chriki, S., Gardner, G.E., Jurie, C., Picard, B., Micol, D., Brun, J.-P., Journaux, L., and Hocquette, J.-F. (2012). Cluster analysis application identifies muscle characteristics of importance for beef tenderness. *BMC Biochem.* 13, 29.
- 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.
- Coleman, M.E., DeMayo, F., Yin, K.C., Lee, H.M., Geske, R., Montgomery, C., and Schwartz, R.J. (1995). Myogenic Vector Expression of Insulin-like Growth Factor I Stimulates Muscle Cell Differentiation and Myofiber Hypertrophy in Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* 270, 12109–12116.
- Correia, J.C., Ferreira, D.M.S., and Ruas, J.L. (2015). Intercellular: local and systemic actions of skeletal muscle PGC-1s. *Trends Endocrinol. Metab.* 26, 305–314.
- Cunningham, J.T., Rodgers, J.T., Arlow, D.H., Vazquez, F., Mootha, V.K., and Puigserver, P. (2007). mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1 α transcriptional complex. *Nature* 450, 736–740.
- Da Cruz, S., Parone, P.A., Lopes, V.S., Lillo, C., McAlonis-Downes, M., Lee, S.K., Vetto, A.P., Petrosyan, S., Marsala, M., Murphy, A.N., et al. (2012). Elevated PGC-1 α activity sustains mitochondrial biogenesis and muscle function without extending survival in a mouse model of inherited ALS. *Cell Metab.* 15, 778–786.
- Du, M., Tong, J., Zhao, J., Underwood, K.R., Zhu, M., Ford, S.P., and Nathanielsz, P.W. (2010). Fetal programming of skeletal muscle development in ruminant animals. *J. Anim. Sci.* 88, E51–60.
- Fan, M., Rhee, J., St-Pierre, J., Handschin, C., Puigserver, P., Lin, J., Jäeger, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Spiegelman, B.M. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1 α : modulation by p38 MAPK. *Genes Dev.* 18, 278–289.
- Felder, T.K., Soyal, S.M., Oberkofler, H., Hahne, P., Auer, S., Weiss, R., Gadermaier, G., Miller, K., Krempler, F., Esterbauer, H., et al. (2011). Characterization of novel peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) isoform in human liver. *J. Biol. Chem.* 286, 42923–42936.
- Finck, B.N., and Kelly, D.P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J. Clin. Invest.* 116, 615–622.

- Gagnière, H., Picard, B., Jurie, C., and Geay, Y. (1997). Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-muscled cattle. *Meat Sci.* *45*, 145–152.
- Gleyzer, N., and Scarpulla, R.C. (2011). PGC-1-related Coactivator (PRC), a Sensor of Metabolic Stress, Orchestrates a Redox-sensitive Program of Inflammatory Gene Expression. *J. Biol. Chem.* *286*, 39715–39725.
- Gondin, J., Brocca, L., Bellinzona, E., D'Antona, G., Maffiuletti, N.A., Miotti, D., Pellegrino, M.A., and Bottinelli, R. (2011). Neuromuscular electrical stimulation training induces atypical adaptations of the human skeletal muscle phenotype: a functional and proteomic analysis. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *110*, 433–450.
- Gravel, S.-P. (2018). Deciphering the Dichotomous Effects of PGC-1 α on Tumorigenesis and Metastasis. *Front. Oncol.* *8*, 75.
- Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménissier, F., Massabanda, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. *Nat. Genet.* *17*, 71–74.
- Grobet, L., Poncelet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Ménissier, F., Zanotti, M., Dunner, S., and Georges, M. (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Genome Off. J. Int. Mamm. Genome Soc.* *9*, 210–213.
- Hafen, P.S., Preece, C.N., Sorensen, J.R., Hancock, C.R., and Hyldahl, R.D. (2018). Repeated exposure to heat stress induces mitochondrial adaptation in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985*.
- Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T., and Spiegelman, B.M. (2003). An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α expression in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7111–7116.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* *18*, 1926–1945.
- He, X., Sun, C., Wang, F., Shan, A., Guo, T., Gu, W., Cui, B., and Ning, G. (2012). Peri-implantation lethality in mice lacking the PGC-1-related coactivator protein. *Dev. Dyn.* *241*, 975–983.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., et al. (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* *413*, 179–183.
- Hittel, D.S., Berggren, J.R., Shearer, J., Boyle, K., and Houmard, J.A. (2009). Increased secretion and expression of myostatin in skeletal muscle from extremely obese women. *Diabetes* *58*, 30–38.

Hunter, R.B., and Kandarian, S.C. (2004). Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J. Clin. Invest.* *114*, 1504–1511.

Huxley, H.E. The crossbridge mechanism of muscular contraction and its implications. *J Exp Biol* 1985, *115*: 17-30

Hwang, Y.-H., Kim, G.-D., Jeong, J.-Y., Hur, S.-J., and Joo, S.-T. (2010). The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Sci.* *86*, 456–461.

Jäger, S., Handschin, C., St.-Pierre, J., and Spiegelman, B.M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12017–12022.

Joulia-Ekaza, D., Dominique, J.-E., Cabello, G., and Gérard, C. (2006). Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp. Cell Res.* *312*, 2401–2414.

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

Kamei, Y., Ohizumi, H., Fujitani, Y., Nemoto, T., Tanaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Miyoshi, M., Ezaki, O., and Kakizuka, A. (2003). PPAR γ coactivator 1 β /ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12378–12383.

Karim, L., Coppieters, W., Grobet, L., Valentini, A., and Georges, M. (2000). Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim. Genet.* *31*, 396–399.

Karunaratne, J.F., Ashton, C.J., and Stickland, N.C. (2005). Fetal programming of fat and collagen in porcine skeletal muscles. *J. Anat.* *207*, 763–768.

Kirchofer, K.S., Calkins, C.B., and Gwartney, B.L. (2002). Fiber-type composition of muscles of the beef chuck and round. *J. Anim. Sci.* *80*, 2872–2878.

Kuang, S., Gillespie, M.A., and Rudnicki, M.A. (2008). Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* *2*, 22–31.

Kupr, B., and Handschin, C. (2015). Complex Coordination of Cell Plasticity by a PGC-1 α -controlled Transcriptional Network in Skeletal Muscle. *Front. Physiol.* *6*.

Lai, K.-M.V., Gonzalez, M., Poueymirou, W.T., Kline, W.O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T.N., Economides, A.N., Yancopoulos, G.D., and Glass, D.J. (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9295–9304.

Lai, L., Leone, T.C., Zechner, C., Schaeffer, P.J., Kelly, S.M., Flanagan, D.P., Medeiros, D.M., Kovacs, A., and Kelly, D.P. (2008). Transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. *Genes Dev.* 22, 1948–1961.

J.J. Lauvergne, B. Vissac, A. Perramon. ÉTUDE DU CARACTÈRE CULARD. I. MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences*, 1963, 12 (2), pp.133-156. <hal-00886796>

Lee, S.-J. (2004). Regulation of Muscle Mass by Myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 61–86.

Lefta, M., Wolff, G., and Esser, K.A. (2011). Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *Curr. Top. Dev. Biol.* 96, 231–271.

Lehman, J.J., Barger, P.M., Kovacs, A., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., and Kelly, D.P. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J. Clin. Invest.* 106, 847–856.

Lelliott, C.J., Medina-Gomez, G., Petrovic, N., Kis, A., Feldmann, H.M., Bjursell, M., Parker, N., Curtis, K., Campbell, M., Hu, P., et al. (2006). Ablation of PGC-1 β Results in Defective Mitochondrial Activity, Thermogenesis, Hepatic Function, and Cardiac Performance. *PLoS Biol.* 4.

Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., et al. (2005). PGC-1 α Deficiency Causes Multi-System Energy Metabolic Derangements: Muscle Dysfunction, Abnormal Weight Control and Hepatic Steatosis. *PLoS Biol.* 3.

Lerin, C., Rodgers, J.T., Kalume, D.E., Kim, S., Pandey, A., and Puigserver, P. (2006). GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1 α . *Cell Metab.* 3, 429–438.

Li, C., Sun, D., Zhang, S., Yang, S., Alim, M.A., Zhang, Q., Li, Y., and Liu, L. (2016). Genetic effects of FASN, PPARGC1A, ABCG2 and IGF1 revealing the association with milk fatty acids in a Chinese Holstein cattle population based on a post genome-wide association study. *BMC Genet.* 17.

Li, M., Liu, M., Liu, D., Lan, X., Lei, C., and Chen, H. (2014). The novel coding region SNPs of PPARGC1A gene and their associations with growth traits in Chinese native cattle. *Mol. Biol. Rep.* 41, 39–44.

Li, X., Monks, B., Ge, Q., and Birnbaum, M.J. (2007). Akt/PKB regulates hepatic metabolism by directly inhibiting PGC-1 α transcription coactivator. *Nature* 447, 1012–1016.

- Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., and Spiegelman, B.M. (2002a). Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1 β (PGC-1 β), A Novel PGC-1-related Transcription Coactivator Associated with Host Cell Factor. *J. Biol. Chem.* 277, 1645–1648.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., et al. (2002b). Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418, 797–801.
- Lin, J., Tarr, P.T., Yang, R., Rhee, J., Puigserver, P., Newgard, C.B., and Spiegelman, B.M. (2003). PGC-1 β in the Regulation of Hepatic Glucose and Energy Metabolism. *J. Biol. Chem.* 278, 30843–30848.
- Lin, J., Wu, P.-H., Tarr, P.T., Lindenberg, K.S., St-Pierre, J., Zhang, C.-Y., Mootha, V.K., Jäger, S., Vianna, C.R., Reznick, R.M., et al. (2004). Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice. *Cell* 119, 121–135.
- Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 1, 361–370.
- Liu, C.-T., and Brooks, G.A. (2012). Mild heat stress induces mitochondrial biogenesis in C2C12 myotubes. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 112, 354–361.
- Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J., and Lin, J.D. (2007). Transcriptional coactivator PGC-1 α integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature* 447, 477–481.
- Lundberg, T.R., Fernandez-Gonzalo, R., Norrbom, J., Fischer, H., Tesch, P.A., and Gustafsson, T. (2014). Truncated splice variant PGC-1 α 4 is not associated with exercise-induced human muscle hypertrophy. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 212, 142–151.
- Lustig, Y., Ruas, J.L., Estall, J.L., Lo, J.C., Devarakonda, S., Laznik, D., Choi, J.H., Ono, H., Olsen, J.V., and Spiegelman, B.M. (2011). Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1 α through S6 kinase. *Genes Dev.* 25, 1232–1244.
- Martyn, J.K., Bass, J.J., and Oldham, J.M. (2004). Skeletal muscle development in normal and double-musced cattle. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 281, 1363–1371.
- Mavalli, M.D., DiGirolamo, D.J., Fan, Y., Riddle, R.C., Campbell, K.S., Groen, T. van, Frank, S.J., Sperling, M.A., Esser, K.A., Bamman, M.M., et al. (2010). Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *J. Clin. Invest.* 120, 4007–4020.
- 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.
- Meirhaeghe, A., Crowley, V., Lenaghan, C., Lelliott, C., Green, K., Stewart, A., Hart, K., Schinner, S., Sethi, J.K., Yeo, G., et al. (2003). Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-

proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem. J.* 373, 155–165.

Miura, S., Kai, Y., Kamei, Y., and Ezaki, O. (2008). Isoform-Specific Increases in Murine Skeletal Muscle Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) mRNA in Response to β 2-Adrenergic Receptor Activation and Exercise. *Endocrinology* 149, 4527–4533.

Molkentin, J.D., Jobe, S.M., and Markham, B.E. (1996). Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 1211–1225.

Monsalve, M., Wu, Z., Adelmant, G., Puigserver, P., Fan, M., and Spiegelman, B.M. (2000). Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol. Cell* 6, 307–316.

Morissette, M.R., Cook, S.A., Buranasombati, C., Rosenberg, M.A., and Rosenzweig, A. (2009). Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 297, 1124–1132.

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.

Münsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P., and Lassar, A.B. (1995). Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev.* 9, 2911–2922.

Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E.R., Sweeney, H.L., and Rosenthal, N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat. Genet.* 27, 195–200.

Norrbom, J., Sällstedt, E.K., Fischer, H., Sundberg, C.J., Rundqvist, H., and Gustafsson, T. (2011). Alternative splice variant PGC-1 α -b is strongly induced by exercise in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 301, E1092–E1098.

Olesen, J., Kiilerich, K., and Pilegaard, H. (2010). PGC-1 α -mediated adaptations in skeletal muscle. *Pflugers Arch.* 460, 153–162.

Olson, B.L., Hock, M.B., Ekholm-Reed, S., Wohlschlegel, J.A., Dev, K.K., Kralli, A., and Reed, S.I. (2008). SCFCdc4 acts antagonistically to the PGC-1 α transcriptional coactivator by targeting it for ubiquitin-mediated proteolysis. *Genes Dev.* 22, 252–264.

Pallafacchina, G., Calabria, E., Serrano, A.L., Kalhovde, J.M., and Schiaffino, S. (2002). A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9213–9218.

- 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.
- Petropoulos, H., and Skerjanc, I.S. (2002). Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 15393–15399.
- Philp, A., Belew, M.Y., Evans, A., Pham, D., Sivia, I., Chen, A., Schenk, S., and Baar, K. (2011). The PGC-1 α -related coactivator promotes mitochondrial and myogenic adaptations in C2C12 myotubes. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301, R864–R872.
- Picard, B., Duris, M.P., and Jurie, C. (1998). Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. *Histochem. J.* 30, 473–479.
- Picard, B., Lefaucheur, L., Berri, C., and Duclos, M.J. (2002). Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 415–431.
- Popov, D.V., Lysenko, E.A., Kuzmin, I.V., Vinogradova, V., and Grigoriev, A.I. (2015). Regulation of PGC-1 α Isoform Expression in Skeletal Muscles. *Acta Naturae* 7, 48–59.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998a). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.
- Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.-Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2001). Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. *Mol. Cell* 8, 971–982.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C.J., Yoon, J.C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D., et al. (2003). Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature* 423, 550–555.
- Renand G., Touraille C., Geay Y., Berge P., Lepetit J., Picard B., (1997) Variability of beef meat quality traits in relation with muscle characteristics. *Renc. Rech. Ruminants* 1997, 4, 311 - 314
- Riehle, C., and Abel, E.D. (2012). PGC-1 Proteins and Heart Failure. *Trends Cardiovasc. Med.* 22, 98–105.
- Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A., et al. (2009). Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J. Cell Biol.* 187, 859–874.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434, 113–118.

Rodriguez, J., Vernus, B., Chelh, I., Cassar-Malek, I., Gabillard, J.C., Hadj Sassi, A., Seiliez, I., Picard, B., and Bonniieu, A. (2014). Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 4361–4371.

Rowe, G.C., Jiang, A., and Arany, Z. (2010). PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ. Res.* **107**, 825–838.

Ruas, J.L., White, J.P., Rao, R.R., Kleiner, S., Brannan, K.T., Harrison, B.C., Greene, N.P., Wu, J., Estall, J.L., Irving, B.A., et al. (2012). A PGC-1 α Isoform Induced by Resistance Training Regulates Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell* **151**, 1319–1331.

Russell, A.P., Feilchenfeldt, J., Schreiber, S., Praz, M., Crettenand, A., Gobelet, C., Meier, C.A., Bell, D.R., Kralli, A., Giacobino, J.-P., et al. (2003). Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* **52**, 2874–2881.

Russell, L.K., Mansfield, C.M., Lehman, J.J., Kovacs, A., Courtois, M., Saffitz, J.E., Medeiros, D.M., Valencik, M.L., McDonald, J.A., and Kelly, D.P. (2004). Cardiac-specific induction of the transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha promotes mitochondrial biogenesis and reversible cardiomyopathy in a developmental stage-dependent manner. *Circ. Res.* **94**, 525–533.

Safdar, A., Little, J.P., Stokl, A.J., Hettinga, B.P., Akhtar, M., and Tarnopolsky, M.A. (2011). Exercise Increases Mitochondrial PGC-1 α Content and Promotes Nuclear-Mitochondrial Cross-talk to Coordinate Mitochondrial Biogenesis. *J. Biol. Chem.* **286**, 10605–10617.

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldberg, A.L. (2004). Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell* **117**, 399–412.

Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z.P., Lecker, S.H., Goldberg, A.L., and Spiegelman, B.M. (2006). PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16260–16265.

Sandri, M., Barberi, L., Bijlsma, A.Y., Blaauw, B., Dyar, K.A., Milan, G., Mammucari, C., Meskers, C.G.M., Pallafacchina, G., Paoli, A., et al. (2013). Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology* **14**, 303–323.

Sanger, JW, Wang, J, Fan, Y, White, J and Sanger, JM. Assembly and dynamics of myofibrils. *J Biomed Biotechnol* 2010, 2010: 858606

Sano, M., Tokudome, S., Shimizu, N., Yoshikawa, N., Ogawa, C., Shirakawa, K., Endo, J., Katayama, T., Yuasa, S., Ieda, M., et al. (2007). Intramolecular control of protein stability, subnuclear

compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J. Biol. Chem.* 282, 25970–25980.

Scarpulla, R.C. (2008). Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* 88, 611–638.

Scarpulla, R.C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1269–1278.

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (2011). Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol. Rev.* 91, 1447–1531.

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., Dyar, K.A., Ciciliot, S., Blaauw, B., and Sandri, M. (2013). Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280, 4294–4314.

Schnyder, S., and Handschin, C. (2015). Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone* 80, 115–125.

Shin, S., and Chung, E. (2013). Novel SNPs in the bovine ADIPOQ and PPARGC1A genes are associated with carcass traits in Hanwoo (Korean cattle). *Mol. Biol. Rep.* 40, 4651–4660.

Shoag, J., and Arany, Z. (2010). Regulation of hypoxia-inducible genes by PGC-1 alpha. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 662–666.

Sladek, R., and Bader, J.-A. (1997). The Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor γ Is a Transcriptional Regulator of the Human Medium-Chain Acyl Coenzyme A Dehydrogenase Gene. *MOL CELL BIOL* 17, 10.

Sonoda, J., Mehl, I.R., Chong, L.-W., Nofsinger, R.R., and Evans, R.M. (2007). PGC-1beta controls mitochondrial metabolism to modulate circadian activity, adaptive thermogenesis, and hepatic steatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5223–5228.

Soyal, S.M., Felder, T.K., Auer, S., Hahne, P., Oberkofler, H., Witting, A., Paulmichl, M., Landwehrmeyer, G.B., Weydt, P., and Patsch, W. (2012). A greatly extended PPARGC1A genomic locus encodes several new brain-specific isoforms and influences Huntington disease age of onset. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3461–3473.

Stern, H.M., and Hauschka, S.D. (1995). Neural tube and notochord promote in vitro myogenesis in single somite explants. *Dev. Biol.* 167, 87–103.

Stinckens, A., Luyten, T., Bijttebier, J., Van den Maagdenberg, K., Dieltiens, D., Janssens, S., De Smet, S., Georges, M., and Buys, N. (2008). Characterization of the complete porcine MSTN gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. *Anim. Genet.* 39, 586–596.

Tadaishi, M., Miura, S., Kai, Y., Kano, Y., Oishi, Y., and Ezaki, O. (2011). Skeletal Muscle-Specific Expression of PGC-1 α -b, an Exercise-Responsive Isoform, Increases Exercise Capacity and Peak Oxygen Uptake. *PLoS ONE* 6.

Tamura, Y., Matsunaga, Y., Masuda, H., Takahashi, Y., Takahashi, Y., Terada, S., Hoshino, D., and Hatta, H. (2014). Postexercise whole body heat stress additively enhances endurance training-induced mitochondrial adaptations in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R931–943.

Tang, H., Inoki, K., Lee, M., Wright, E., Khuong, A., Khuong, A., Sugiarto, S., Garner, M., Paik, J., DePinho, R.A., et al. (2014). mTORC1 Promotes Denervation-Induced Muscle Atrophy Through a Mechanism Involving the Activation of FoxO and E3 Ubiquitin Ligases. *Sci Signal* 7, ra18–ra18.

Taylor, W.E., Bhasin, S., Artaza, J., Byhower, F., Azam, M., Willard, D.H., Kull, F.C., and Gonzalez-Cadavid, N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 280, E221–E228.

Thom, R., Rowe, G.C., Jang, C., Safdar, A., and Arany, Z. (2014). Hypoxic Induction of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Angiogenesis in Muscle by Truncated Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator (PGC)-1 α . *J. Biol. Chem.* 289, 8810–8817.

Trausch-Azar, J., Leone, T.C., Kelly, D.P., and Schwartz, A.L. (2010). Ubiquitin Proteasome-dependent Degradation of the Transcriptional Coactivator PGC-1 α via the N-terminal Pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 40192–40200.

Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., and Spiegelman, B.M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab.* 3, 333–341.

Villena, J.A. (2015). New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.* 282, 647–672.

Walenkamp, M.J.E., Karperien, M., Pereira, A.M., Hilhorst-Hofstee, Y., van Doorn, J., Chen, J.W., Mohan, S., Denley, A., Forbes, B., van Duyvenvoorde, H.A., et al. (2005). Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2855–2864.

Wallberg, A.E., Yamamura, S., Malik, S., Spiegelman, B.M., and Roeder, R.G. (2003). Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1 α . *Mol. Cell* 12, 1137–1149.

- Weikard, R., Kühn, C., Goldammer, T., Freyer, G., and Schwerin, M. (2005). The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol. Genomics* 21, 1–13.
- Wen, X., Wu, J., Chang, J.S., Zhang, P., Wang, J., Zhang, Y., Gettys, T.W., and Zhang, Y. (2014). Effect of exercise intensity on isoform-specific expressions of NT-PGC-1 α mRNA in mouse skeletal muscle. *BioMed Res. Int.* 2014, 402175.
- Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124, 471–484.
- Yablonka-Reuveni, Z., Day, K., Vine, A., and Shefer, G. (2008). Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J. Anim. Sci.* 86, E207-216.
- Ydfors, M., Fischer, H., Mascher, H., Blomstrand, E., Norrbom, J., and Gustafsson, T. (2013). The truncated splice variants, NT-PGC-1 α and PGC-1 α 4, increase with both endurance and resistance exercise in human skeletal muscle. *Physiol. Rep.* 1.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., et al. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 413, 131–138.
- Yun, S.-H., Han, S.-H., and Park, J.-I. (2018). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and PGC-1 α in Cancer: Dual Actions as Tumor Promoter and Suppressor. *PPAR Res.* 2018, 6727421.
- Zechner, C., Lai, L., Zechner, J.F., Geng, T., Yan, Z., Rumsey, J.W., Colli, D., Chen, Z., Wozniak, D.F., Leone, T.C., et al. (2010). Total skeletal muscle PGC-1 deficiency uncouples mitochondrial derangements from fiber type determination and insulin sensitivity. *Cell Metab.* 12, 633–642.
- Zhang, Y., Huypens, P., Adamson, A.W., Chang, J.S., Henagan, T.M., Boudreau, A., Lenard, N.R., Burk, D., Klein, J., Perwitz, N., et al. (2009). Alternative mRNA Splicing Produces a Novel Biologically Active Short Isoform of PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* 284, 32813–32826.
- Zhu, M.-J., Ford, S.P., Nathanielsz, P.W., and Du, M. (2004). Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol. Reprod.* 71, 1968–1973.

Résumé

Le coactivateur de facteurs de transcription PGC-1 α (PPARGC1A) est connu pour jouer un rôle clé dans la thermogénèse adaptative ainsi que dans l'homéostasie et la croissance musculaire chez l'homme et la souris. Le gène codant pour PGC-1 α est contrôlé par deux promoteurs et est soumis à un épissage alternatif, il en résulte de multiples protéines. Chez le bovin, malgré son implication dans la croissance et dans les caractéristiques du lait relevée par des études de SNP, le gène et les transcrits de PGC-1 α restent peu étudiés. Ainsi, notre objectif a été de mettre en évidence la structure et l'expression des transcrits de PGC-1 α chez le bovin. Nous avons montré que deux formes longues PGC-1 α -a et PGC-1 α -b étaient exprimées chez le bovin de même que deux formes tronquées NT-PGC-1 α -a et NT-PGC-1 α -b (aussi appelé PGC-1 α 4). En conditions basales, les formes tronquées sont plus exprimées que les formes longues dans le muscle squelettique. De plus, les transcrits dérivants du promoteur proximal sont prédominants, ce qui suggère que NT-PGC-1 α serait la forme prédominante dans le muscle squelettique bovin. Nous avons également créé des lignées cellulaires sur-exprimant indépendamment les formes longues ou tronquées et montré que la sur-expression des isoformes bovins entraînait une différenciation accrue des myoblastes associée à une augmentation de l'expression d'IGF-1 et une sous-expression de la myostatine. La multitude d'isoformes codée par le gène PGC-1 α ainsi que leur implication dans la myogenèse positionne PGC-1 α en gène d'intérêt dans l'étude de la variabilité phénotypique retrouvé chez certaines races bovines. De plus, les transcrits de PGC-1 α semblent être de puissants modulateurs de la masse musculaire. PGC-1 α pourrait donc être un gène de plus à étudier lors de la sélection des animaux domestiques présentant une plus grande musculature.

Mots clés : PPARGC1A ; PGC-1a ; muscle squelettique ; bovin

Abstract

The transcriptional co-activator PGC-1 α (PPARGC1A) has been reported to play a key role in adaptive thermogenesis and to influence muscle homeostasis and growth in mouse and human. PGC-1 α has a complex structure with multiple protein domains whose gene is controlled by two promoters and is subject to alternative splicing events. In cattle, very little is currently known about PGC-1 α , despite its implication in growth and milk characteristics revealed by SNP study. So, the aim of our study was to investigate the presence and the structure of bovine PGC-1 α alternative transcripts. We found different transcripts, two full-length isoforms named PGC-1 α -a and PGC-1 α -b, and two truncated forms, NT-PGC-1 α and PGC-1 α 4. In basal conditions, our results showed that the truncated forms are the most expressed in bovine muscle. In addition, the transcripts derived from the proximal promoter are predominant, suggesting that NT-PGC-1 α would be the main form. Finally, we showed that the overexpression of either fulllength or truncated isoforms of bovine PGC-1 α enhances myoblasts differentiation. The multiplicity of isoforms resulting from PGC-1 α as well as their implication in myogenesis makes PGC-1 α as a gene of interest for the study of the muscular phenotypic variability found in different cattle breeds. In addition, PGC-1 α transcripts appear to be a strong modulators of muscle mass. So the bovine PGC-1 α isoforms could be used to engineer future breeds with higher muscularity.

Key words : PPARGC1A ; PGC-1a ; bovin ; skeletal muscle