

Le gène d'hypertrophie musculaire du « Texel Belge » : identification, impact, introgression

GRASSET D. (1), BOUIX J. (2), BIBE B. (2), LEVEZIEL H. (3), GEORGES M. (4), LAVILLE E. (5)

(1) GEBRO, Groupement des éleveurs de brebis du bassin de Roquefort, Lauras, 12250 Roquefort

(2) INRA – SAGA, BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan

(3) INRA - UMR 1061, génétique moléculaire animale, université de Limoges, 87060 Limoges

(4) Département de génétique, faculté de médecine vétérinaire, université de Liège, 43400 Liège

(5) INRA - UR 370, qualité des produits animaux, 63122 Saint-Genès-Champanelle

RESUME - La mise en évidence de la mutation d'hypermuscularité du Texel Belge est le fruit d'une collaboration entre plusieurs équipes de l'INRA et l'Université de Liège. Elle a impliqué la mobilisation de ressources expérimentales, de mesures fines des caractères, les apports de la génétique quantitative et moléculaire. Le mécanisme est original puisque la mutation n'affecte pas la région codante d'un gène et ne modifie pas de protéine. La mutation crée un site pour deux microARNs venant perturber l'activité de l'ARN transcrit, et donc la synthèse de la myostatine. La cause de l'hypertrophie est l'inhibition de la myostatine au stade fœtal. L'effet de la mutation est modéré par rapport à ses équivalentes en bovin : son intérêt est d'accroître la conformation sans perturber l'équilibre de l'animal. Ainsi l'organisation de sélection du GEBRO a entrepris l'introgression de cette mutation dans sa population Lacaune. Le programme produit actuellement les premiers reproducteurs homozygotes 15/16 Lacaune.

The « Belgium Texel » gene of muscular hypertrophy: identification, impact, introgression

GRASSET D. (1), BOUIX J. (2), BIBE B. (2), LEVEZIEL H. (3), GEORGES M. (4), LAVILLE E. (5)

(1) GEBRO, Groupement des Eleveurs de Brebis du Bassin de Roquefort, Lauras, 12250 Roquefort

The discovery of the double-muscling mutation in the Belgian Texel sheep population is the result of collaborations between several teams of INRA and the University of Liege. It implicated the mobilisation of experimental resources, fine measurements of traits, contributions of quantitative and molecular genetics. The genetic mechanism is original since the mutation is not located in a coding area of a gene, and thus does not lead to a modified protein. In this case the mutation creates, in a non-coding area, a target site for 2 microRNA that disturb the activity of transcribed RNA, and consequently the synthesis of myostatin. Hypertrophy is due to the inhibition of myostatin synthesis at the foetal stage. The effect of this mutation is moderate in comparison with the effects of other types of mutations on the bovine myostatin gene. Therefore the "texel mutation" is of a great zootechnical interest by increasing conformation without disturbing the general equilibrium of the animal. Thus the GEBRO selection organisation undertook introgression of the "texel mutation" in its Lacaune population. The programme is currently producing its first homozygous 15/16 Lacaune reproducers.

INTRODUCTION

Le programme de recherche et de valorisation du gène d'hypertrophie musculaire du Texel Belge s'inscrit dans la continuité des travaux de la recherche et de la profession françaises sur la mesure et l'amélioration des aptitudes bouchères. L'INRA a développé des compétences sur les mesures de la qualité des carcasses pour aboutir à la mise au point de la note EUROP au début des années 1970. A partir du milieu des années 1970 l'INRA s'est impliqué dans la définition et la mise en œuvre d'un protocole de mesures fines des aptitudes bouchères, notamment de la conformation et de l'engraissement, en vue d'une évaluation génétique des reproducteurs.

Du côté professionnel cette période correspondait à la mise en place d'une organisation nationale multiraciale (BerryTest) destinée à faire face à la concurrence croissante des carcasses originaires des îles britanniques et des Pays Bas, avec l'ouverture des marchés européens. Les travaux portaient sur la nécessité d'alourdir les carcasses en réduisant l'état d'engraissement, mais aussi d'améliorer la conformation, en relançant le croisement terminal des races rustiques par des béliers améliorés des races bouchères spécialisées. Dans cette dynamique le GEBRO a mis en place au début des années 1980 une organisation de sélection de son rameau Lacaune viande, en acquérant la méthodologie de production et d'évaluation des carcasses susceptible d'aboutir à l'indexation des reproducteurs.

Ces compétences partagées se sont avérées précieuses à la fin des années 1990, alors que les évolutions de la génomique conduisaient les chercheurs de l'INRA et de l'Université de Liège à se reposer en de nouveaux termes la question de l'existence d'un gène majeur d'hypertrophie musculaire dans les populations Texel hollandaise et belge extrêmement bien conformées. La conjonction de cette réflexion avec la disposition de connaissances et de savoir-faire de la recherche et de la profession sur les mesures et la génétique des aptitudes bouchères, aura permis de mener à bien des travaux entrepris depuis maintenant quinze ans.

1. RECHERCHE DE LA MUTATION

1.1. PROCREATION D'UNE POPULATION EXPERIMENTALE

Pour localiser la région du génome susceptible de porter le gène de l'hypertrophie musculaire, nous avons généré au domaine expérimental INRA de Langlade (Toulouse) deux populations expérimentales croisées entre Texel Belge et Romanov. Dans un premier temps des brebis de race Romanov, choisies pour leur très faible développement musculaire, ont été inséminées entre 1995 et 1997 avec des béliers Texel belge « hypermusclés » issus du centre d'insémination et de sélection ovines (CISO) de Faulx-les-Tombes (Université de Namur). Nous avons ainsi généré une population de mâles et femelles F1 supposés

hétérozygotes TR à l'hypothétique gène de muscularité, T étant l'allèle hypermusclé du Texel, et R celui du Romanov. Dans un second temps, mâles et femelles F1 ont été accouplés pour donner une population 232 agneaux F2 entre 1997 et 2000. L'intérêt de ces croisements était d'obtenir une population expérimentale possédant globalement la moitié des gènes des deux races parentales, mais présentant dans l'hypothèse d'un gène majeur, une forte variabilité génétique en raison de la disjonction des allèles et la coexistence des deux sortes d'homozygotes (TT et RR) et d'hétérozygotes (TR). Par ailleurs nous avons également produit 197 agneaux *Back-cross* (BC) issus du croisement en retour de béliers F1 avec des brebis Romanov ; dans l'hypothèse de gène majeur les animaux BC étaient de génotype TR ou RR. L'ensemble de ces animaux a fait l'objet d'un phénotypage fin pour les caractères de conformation et de muscularité sur la base de quarante mesures morphologiques, histologiques et biochimiques (Laville *et al.*, 2004).

1.2. DETECTION D'UN QTL

Parallèlement aux mesures sur carcasses, nous avons réalisé une primo détection de QTL reposant sur 153 marqueurs microsatellites répartis sur la totalité du génome (Marcq *et al.*, 2002).

1.2.1. Mise en évidence d'un QTL proche du gène de la myostatine

Un QTL présentant un effet majeur sur les caractéristiques musculaires mesurées a ainsi été mis en évidence sur le chromosome 2 des moutons (OAR2), dans une zone de 10cM incluant le gène de la myostatine (GDF8). Ce gène est connu comme régulateur négatif de la prolifération cellulaire au stade fœtal. Des mutations conduisant à la perte de fonction de ce gène sont décrites chez la souris, les bovins et l'homme présentant des hypertrophies musculaires ce qui en faisait le candidat idéal pour le « gène Texel ».

1.2.2. Pas de mutation dans les régions codantes de GDF8

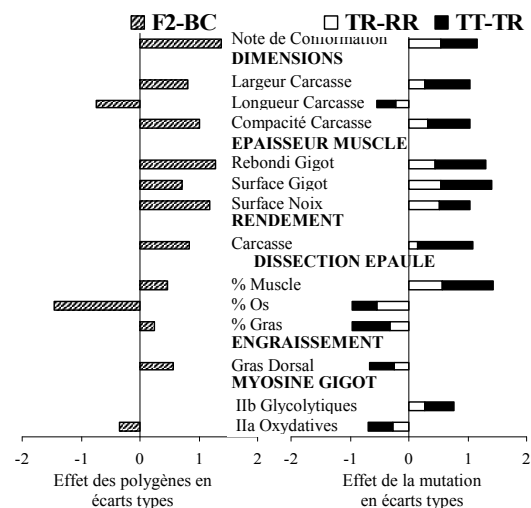
Cependant, le séquençage de la région codante du gène GDF8 n'a révélé aucun polymorphisme entre animaux Texel hypertrophiés et Romanov, ni avec d'autres types d'ovins. De même, des études d'expression du gène GDF8, soit au niveau des ARN messagers, soit au niveau de la protéine, n'ont révélé aucune différence entre les deux types d'animaux.

1.3. EFFETS RESPECTIFS DES POLYGENES ET DU QTL

Le typage de deux microsatellites mutés en race Texel (BM81124 et BULGE20) flanquant le QTL, a permis d'identifier les haplotypes parentaux. La population expérimentale a été ainsi structurée en trois classes en fonction des trois haplotypes définis par ces marqueurs : Texel-Texel (TT), Texel-Romanov (TR), et Romanov-Romanov (RR).

Connaissant le type génétique (F2 avec 50 % de gènes Texel ou BC avec 25 %) et l'haplotype du QTL il a été possible de dissocier l'effet du QTL de celui des polygènes, sachant que l'écart F2-BC représente 25 % de l'écart entre les deux races parentales (Laville *et al.*, 2004, figure 1)

Figure 1 : effets des polygènes et du QTL (en écarts types)



1.3.1. Effets des polygènes Texel

La supériorité polygénique de la race Texel s'établit ainsi à 2,8 notes EUROP. Les carcasses sont plus larges et plus courtes, les segments plus courts, l'épaisseur des muscles est supérieure ce qui augmente la compacité. Le rendement de carcasse est supérieur. La proportion de muscle augmente légèrement, celle de gras n'est pas modifiée, alors que celle de l'os diminue fortement. Le type métabolique des fibres musculaire n'est pas modifié.

1.3.2. Effets du QTL

Le QTL « Texel » améliore en moyenne la conformation de 0,6 note EUROP (0,75 pour les F2). La largeur et la compacité des carcasses sont supérieures mais les longueurs de la carcasse et des segments sont peu modifiées. L'épaisseur des muscles est supérieure, de forme plus compacte. Le rendement de carcasse est amélioré. La proportion de muscle augmente nettement, celles de gras et d'os diminuant d'autant.

La typologie métabolique des muscles est modifiée. Ils sont plus glycolytiques et présentent moins de capillaires sanguins.

1.3.3. Comparaison des effets

Les deux effets convergent sur certains caractères : la note de conformation supérieure, des carcasses plus compactes, une morphologie musculaire plus épaisse offrant un meilleur usage pour la découpe, un rendement de carcasse supérieur, une quantité de muscle supérieure et une quantité d'os inférieure. Sur d'autres caractères, les effets divergent : les longueurs relatives de la carcasse et des segments, la quantité relative de gras, la typologie biochimique des muscles.

1.3.4. Effets du QTL sur la structure et la texture des muscles

L'hypertrophie est due à une augmentation du nombre de fibres musculaires, leur diamètre n'est pas modifié. Ce mécanisme correspond à celui décrit chez les bovins présentant une mutation sur GDF8. Ces muscles présentent moins de collagène. La texture de la viande cuite obtenue par une mesure mécanique n'est pas modifiée.

1.4. LOCALISATION FINE DU GENE

L'intervalle de confiance pour la localisation du gène sur le chromosome a été affiné par analyse de déséquilibre de liaison : en utilisant un plus grand nombre de marqueurs microsatellites issus des études de BACs et en observant les descendants de béliers recombinants (porteurs d'un

haplotype Texel incomplet). Cette analyse a permis de réduire la taille du segment chromosomique contenant le gène responsable de l'hypertrophie musculaire à 2cM. La zone ainsi délimitée incluait toujours GDF8. A la lueur de ces différents résultats, nous avons décidé de réexaminer GDF8.

1.5. MISE EN EVIDENCE DE LA MUTATION

Nous avons entrepris le séquençage du gène au-delà de sa région codante. Dix mutations ponctuelles d'un nucléotide (SNPs) ont été identifiées. Parmi ces SNPs, l'un d'entre eux, g+6723G-A, localisé dans la région 3'UTR du gène, s'est révélé particulièrement intéressant puisque l'allèle A était en effet présent chez 99 % des animaux Texel.

1.5.1. Une mutation dans une zone non codante de GDF8 – un mécanisme particulier

L'examen détaillé des séquences flanquantes de ce SNP a montré que la mutation créait un motif octamère (ACATTCCA) susceptible d'être la cible de deux microARNs hautement exprimés dans le muscle squelettique. Nous avons montré que le gène correspondant aux microARNs était présent chez le mouton et que ces microARNs étaient bien exprimés dans le muscle de mouton. La mutation dans la région 3'UTR de GDF8 crée donc sur les ARNs transcrits de GDF8 un site cible illégitime pour les deux microARNs, entraînant la dégradation des transcrits et par conséquent une inhibition de la synthèse de la protéine. Au stade fœtal, la myostatine inhibe la prolifération cellulaire ; son inactivation a pour conséquence un maintien de la prolifération cellulaire et conduit donc à une hypertrophie musculaire.

1.5.2. Preuves du mécanisme de la mutation

Des analyses complémentaires ont été réalisées pour valider cette hypothèse (Clop *et al.*, 2006). Parmi ces analyses, nous avons montré par *western blot* la présence en moins grande quantité de la myostatine dans du sérum d'animaux porteurs de la mutation. Cette démonstration n'avait pas pu être faite plus tôt car aucun anticorps spécifique n'était alors disponible.

Par ailleurs, nous avons montré par *hot-stop* PCR, un différentiel d'abondance des ARN transcrits de chacun des deux allèles (muté vs. non muté) chez un agneau hétérozygote. Cette approche dans le même animal, qui s'abstrait ainsi de la variation individuelle et de la variabilité technique, s'est révélée beaucoup plus sensible que notre précédente approche basée sur la comparaison de l'expression du gène entre deux homozygotes.

2. INTROGRESSION DU GÈNE « TEXEL » EN RACE LACAUNE

Le consortium franco-belge de recherche à l'origine de cette découverte a souhaité ne pas la breveter de manière à laisser la mutation à disposition de toute population qui souhaiterait la valoriser. Contrairement au caractère culard conféré par les mutations de GDF8 en bovins, la mutation Texel provoque à l'état homozygote un effet compris entre 0,5 et 1 note EUROP. Sachant que l'écart-type intra race de la conformation est d'environ 0,5 note EUROP cette mutation n'altère pas l'équilibre des animaux qui conservent ainsi les caractéristiques de leur race.

Faisant sienne cette analyse, le GEBRO a souhaité apporter une nouvelle dimension à son programme de sélection des aptitudes bouchères, en intégrant le gène Texel dans sa population. Un programme d'introgession a été défini sous la responsabilité scientifique de l'INRA, et mis en œuvre par le GEBRO dans le cadre de l'OS UPRA

Lacaune qui reconnaît cette nouvelle population en devenir (figure 2).

2.1. VERIFICATION DE L'EFFET DE LA MUTATION EN RACE LACAUNE DES LE PREMIER CROISEMENT TEXEL

Le processus d'introgession consiste à introduire un gène d'intérêt d'une population étrangère à l'exclusion des autres gènes. Un premier accouplement a eu lieu en fin de 2003 avec l'insémination artificielle (IA) de vingt quatre brebis d'élite Lacaune GEBRO par quatre béliers Texel Belges du CISO, choisis bien « viandeux » et homozygotes TT. Quatre des huit béliers F1 issus de ce premier croisement ont été accouplés par IA avec des agnelles Lacaune laitières. Les pères F1 étant par construction hétérozygotes TL, la moitié des soixante quinze descendants avait un haplotype TL, et l'autre moitié était homozygote LL. La comparaison entre les deux groupes indique un écart de 0,44 notes EUROP, comparable à celui observé en environnement Romanov.

2.2. PREMIERES ETAPES DE L'INTROGRESSION

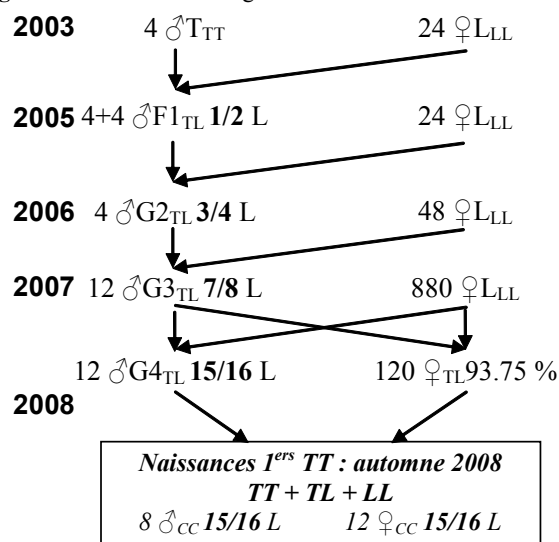
Sur la base de ce résultat positif (l'inverse aurait entraîné l'arrêt du programme) les premières étapes d'élimination de l'environnement génétique Texel se sont enchaînées selon un intervalle de génération de un an. Tous les croisements en retour vers la race Lacaune ont été effectués sur des brebis d'élite : mères à bélier et / ou filles de mâles élite, de façon à obtenir des animaux homozygotes culards dotés par ailleurs de bonnes aptitudes maternelles.

Quatre autres béliers F1 ont été accouplés à l'âge de sept mois à vingt quatre brebis Lacaune pour produire des fils G2 avec 75 % de gènes Lacaune. Après tri phénotypique et génotypage on a obtenu quatre fils G2 de génotype TL, eux-mêmes accouplés à l'âge de sept mois à quarante huit brebis Lacaune. On a obtenu ainsi en 2006 douze béliers G3 7/8 Lacaune hétérozygotes TL.

Les génotypages ont été réalisés à Labogena ; ils portaient au début sur les microsattellites proches du QTL, puis à partir de 2006 directement sur le SNP g+6723G-A responsable de la mutation. L'introgession a donc commencé avec les marqueurs du QTL pour continuer avec le gène lui-même.

Une disposition importante adoptée par le GEBRO a été de confiner dans un seul élevage cette première étape nécessitant un effectif de brebis très limité, de manière à éviter tout risque de dissémination intempestive.

Figure2 : schéma de l'introgession



2.3. VERS L'HOMOZYGOTIE

Les mâles 7/8 Lacaune G3 ont alors été accouplés par IA en 2007 à 880 mères à bélier du réseau de sélectionneurs du GEBRO, de façon à procurer douze mâles et cent vingt femelles G4 TL possédant 15/16 de gènes Lacaune. Les mâles ont rejoint le centre d'IA de la confédération générale de Roquefort à Saint-Affrique (Aveyron), et les femelles ont été regroupées dans un seul élevage. Les jeunes reproducteurs retenus sont tous de génotype ARR-ARR résistant à la tremblante.

A cette étape il convient de chercher à minimiser la probabilité de présence d'allèles spécifiques du Texel autres que le culard. Il faudrait pour cela procéder à un génotypage de tous les candidats portant sur au moins un marqueur de chacun des vingt six chromosomes. Le coût étant prohibitif nous avons choisi de faire un tri sur le standard de la race dans la mesure du possible. Un choix a pu être opéré vers l'âge de deux mois avec une élimination de l'ordre de 55 %. Un important choix supplémentaire a pu être effectué chez les mâles puisque parmi quatre vingt trois candidats contrôlés dans la station de contrôle individuel du GEBRO quinze ont été retenus.

Les premiers animaux homozygotes sont nés en automne 2008, et l'objectif immédiat est d'accroître les effectifs pour obtenir une vingtaine de béliers 15/16 homozygotes TT et quelques centaines de brebis. Aujourd'hui le centre d'IA possède cinq béliers homozygotes et vingt hétérozygotes 15/16. Ces béliers ont été gérés depuis le début du programme entre quatre familles paternelles issues des quatre fondateurs Texel de 2003.

2.4. PERSPECTIVES

2.4.1 Vérification des aptitudes des homozygotes culards

Une comparaison récente de quelques carcasses d'agneaux 15/16 Lacaune hétérozygotes ou homozygotes non porteurs, semble confirmer le gain de conformation et donc l'intérêt de la mutation. D'autres comparaisons seront effectuées sachant qu'il est difficile en cette période de constitution des cheptels, de mobiliser des homozygotes culards représentatifs.

Il reste cependant l'inconnue des aptitudes maternelles même si les accouplements ont toujours mobilisé des brebis d'élite. Pour évaluer ces aptitudes les premières femelles homozygotes vont être élevées dans un élevage unique pour être comparées à des contemporaines Lacaune. Par ailleurs au domaine INRA de la Sapinière (Bourges) un protocole d'évaluation des aptitudes maternelles des homozygotes culards entre dans sa deuxième année. Les brebis sont des demi-sang croisées Texel Belge avec des Romanov ou des Romane-INRA 401.

2.4.2. Objectif final du programme

Des réflexions sont en cours au sein du GEBRO sur l'objectif final du programme dans l'attente de l'évaluation des aptitudes maternelles.

Les idées oscillent entre deux configurations extrêmes : la minimale consiste à constituer un troupeau de 200-300 brebis homozygotes pour entretenir un noyau de quelques dizaines de béliers d'IA destinés à du croisement terminal. L'autre objectif est l'introgession progressive de la mutation dans l'ensemble de la population GEBRO.

Dans tous les cas il faut gérer dans le même schéma la poursuite de la sélection des animaux porteurs et non porteurs de la mutation.

CONCLUSION

Le processus conduisant de l'hypothèse de l'existence d'une mutation à son utilisation dans une population, est un processus long et complexe avec de nombreuses étapes à parcourir. Pour ce gène Texel il aura fallu la collaboration entre plusieurs équipes de recherche puis avec un organisme professionnel - sans oublier l'appui de l'OES Lacaune et de l'Institut de l'élevage - sur un objectif partagé et poursuivi avec persévérance.

La mise en évidence de la mutation, l'évaluation de l'intérêt de son effet, puis sa valorisation ne vont pas de soi. D'autres approches seraient à envisager dans d'autres situations, notamment avec les évolutions récentes des sciences et des techniques, mais notre propos était d'explicitier l'essentiel de l'histoire des travaux sur cette mutation d'hypermuscularité du Texel.

Allèles : T = Texel culard - L = Lacaune (normal)

Génotypes : TT = homozygote culard, LL = homozygote normal, TL = hétérozygote,

Type racial : L = Lacaune, T = Texel

La production, les prélèvements pour le génotypage, l'abattage des agneaux sont assurés par le GEBRO

Ce programme a été financé par l'ANR-05-Génanimal et par ApisGene

F. Marcq, C. Larzul, V. Marot, J. Bouix, F. Eychenne, E. Laville, B. Bibé, P.L. Leroy, M. Georges and J.M. Elsen. 2002. *7th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production, August 19-23, 2002, Montpellier, France.*

E.Laville, J.Bouix, T.Sayd, B.Bibé, J.M.Elsen, C. Larzul, F.Eychenne, F. Marcq, M. Georges. 2004. *Journal of Animal Science, 82 : 3128-3137.*

Alex Clop, F. Marcq, H. Takeda, D. Pirottin, J. Tobin, B. Bibé, J. Bouix, F. Caiment, J-M. Elsen, F. Eychenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, X. Tordoir, C. Charlier & M. Georges. 2006. *Nature Genetics, 38 (7): 813-818.*