



HAL
open science

Impact de la perte de fonction du gène HACD1 sur la gestation et la lactation de la souris

Antoine Ramont

► **To cite this version:**

Antoine Ramont. Impact de la perte de fonction du gène HACD1 sur la gestation et la lactation de la souris. Médecine vétérinaire et santé animale. 2024. dumas-04810886

HAL Id: dumas-04810886

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04810886v1>

Submitted on 29 Nov 2024

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.

Copyright

Année 2024

IMPACT DE LA PERTE DE FONCTION DU GÈNE *HACD1* SUR LA GESTATION ET LA LACTATION DE LA SOURIS

THÈSE

Pour obtenir le diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

La Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)

Le 15 octobre 2024

Par

Antoine Gérard Bernard RAMONT

Sous la direction de

Fanny PILOT-STORCK

JURY

Président du jury :	M. Alain FONTBONNE	Professeur à l'EnvA
Directrice de thèse :	Mme Fanny PILOT-STORCK	Professeur à VetAgro Sup
Examineur :	M. Sylvain BELLIER	Professeur à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



version mai 2024

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
Mme	Benckekroun	Ghita	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
Mme	Chastant	Sylvie	Professeur	DPASP
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneq	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Professeur	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Béguin	Jérémy	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
Mme	Mitimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Radière	Guéric	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérange	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC

Remerciements

Au Président du Jury de cette thèse, Alain Fontbonne Professeur à l'EnvA,

Qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse, je vous remercie sincèrement.

A Mme Fanny Pilot-Storck, Professeur à l'EnvA,

Pour avoir accepté de m'encadrer sur ce travail de thèse. Merci sincèrement pour vos conseils, votre gentillesse et votre disponibilité. Ce fut un vrai plaisir de travailler avec vous, merci beaucoup de votre confiance accordée dans la réalisation de cette thèse.

A M. Sylvain Bellier, Professeur à l'EnvA,

Pour avoir accepté le rôle d'assesseur de cette thèse, je vous remercie sincèrement.

A M. Laurent Tiret, M. Laurent Guillaud, M. Ibrahim Adamou, Mme Soumaya Jadoui, Sarah, Flavie et cyprien.

Pour votre aide précieuse pendant la réalisation de ce travail. Je vous remercie sincèrement.

A ma famille,

Pour avoir toujours été là pour moi et pour votre soutien pendant toutes ces années, je vous remercie de tout mon cœur

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations	6
Introduction.....	7
Première partie : bibliographie	9
1. Les myopathies	9
A. <i>Les myopathies centronucléaires chez l'humain</i>	9
a. La myopathie centronucléaire liée à l'X.....	9
b. Les myopathies centronucléaires autosomiques dominantes	9
c. Les myopathies centronucléaires autosomiques récessives.....	10
B. <i>Les myopathies centronucléaires chez le chien</i>	10
a. Description des myopathies chez le chien	10
b. Mise en évidence de la mutation responsable de la CMN autosomique canine	11
C. <i>La myopathie autosomique récessive liée à HACD1</i>	13
a. Identification de la fonction du gène HACD1	13
b. Myopathie par mutation du gène HACD1 chez l'humain.....	14
c. Conséquences de la mutation du gène Hacd1 sur la fusion cellulaire	15
d. Conséquences de la mutation du gène Hacd1 sur le métabolisme	17
2. Les acides gras à très longue chaîne et leur élongation	22
A. <i>Élongation des acides gras</i>	22
a. Synthèse des acides gras à longue chaîne par le complexe Fatty acid synthase.....	22
b. Synthèse des acides gras à très longue chaîne à partir des acide gras à longue chaîne	23
c. Insaturation des acides gras.....	24
d. Les acides gras à nombre impair de carbones.....	24
e. Synthèse des sphingolipides à partir des acides gras à très longue chaîne	25
B. <i>Fonction des acides gras à très longue chaîne et des lipides dérivés</i>	25
3. Accouplement, gestation et lactation chez la souris	27
A. <i>Fécondation et gestation chez la souris</i>	27
B. <i>La lactation chez la souris</i>	28
4. Composition du lait	29
A. <i>Composition du lait humain</i>	29
a. Composition générale.....	29
b. Composition lipidique	31
B. <i>Composition du lait de souris</i>	33
a. Composition générale.....	33
b. Composition lipidique	33
C. <i>Implication des lipides dans la gestation et le développement post-natal</i>	35
D. <i>Autres mutations connues du cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne influençant la gestation et la composition du lait</i>	36
5. Étude de l'impact de la perte de fonction du gène <i>Hacd1</i> sur la gestation et la lactation de la souris.....	37
Deuxième partie : étude expérimentale	39
1. Introduction.....	39
2. Matériels et méthodes	39
A. <i>Modèle animal utilisé</i>	39
B. <i>Accouplement et suivi de gestation</i>	41
C. <i>Suivi des femelles et des souriceaux au cours de la lactation</i>	43
D. <i>Mise à mort et prélèvements des souriceaux</i>	44
E. <i>Mise à mort et prélèvements des mères</i>	44
F. <i>Analyse lipidomique</i>	44
G. <i>Analyse statistique</i>	45
3. Résultats.....	45
A. <i>Accouplement et gestation</i>	45
a. Observation générale	45
b. Comparaison des poids des parents à l'accouplement.....	45
c. Accouplement et isolement	46
d. Évolution des poids des femelles au cours de la gestation en fonction du génotype.....	47
B. <i>Croissance des souriceaux pendant la lactation</i>	49
a. Comparaison du nombre de souriceaux en fonction du génotype des parents.	49

b. Gestion des problèmes de croissance survenus au cours de l'élevage des souriceaux.....	50
c. Comparaison de l'évolution du poids des souriceaux	51
C. Évolution du poids des mères au cours de la lactation	53
a. Évolution du poids des mères au cours de la lactation en fonction du groupe.....	53
b. Corrélation entre l'évolution du poids des mères et le nombre de petits.....	54
c. Comparaison de l'anabolisme absolu et relatif des mères par groupe d'étude	55
D. Paramètres des souriceaux.....	57
a. Poids et glycémie	57
b. Poids des organes	59
E. Prélèvements des mères au sevrage	60
a. Poids des mères.....	60
b. Poids des organes.....	61
F. Étude de la composition lipidique du lait	62
4. Discussion	65
A. Accouplement et gestation	65
B. Évolution du poids des femelles au cours de la lactation	65
C. Lactation et croissance des souriceaux.....	66
D. Prélèvements des souriceaux	66
E. Prélèvements des mères.....	66
F. Composition lipidique du lait.....	67
Conclusion	69
Liste des références bibliographiques	71
Annexe 1 : Suivi du poids des souriceaux.....	75
Annexe 2 : Paramètres des souriceaux	78
Annexe 3 : Paramètres des mères	79
Annexe 4 : Analyse lipidomique en quantité relative	80
Annexe 5 : Calcul de l'anabolisme des mères	81

Liste des figures

Figure 1 : Principaux signes cliniques retrouvés chez les labradors atteints de la myopathie centronucléaire liée à <i>HACD1</i> (Maurer <i>et al.</i> , 2012).....	10
Figure 2 : Coupes histologiques transversales de biceps fémoral de chien atteint de la myopathie centronucléaire liée à <i>HACD1</i> , coloration hémalum-éosine (Tiret <i>et al.</i> , 2003).....	11
Figure 3 : <i>PTPLA</i> et ses transcrits (Pelé <i>et al.</i> , 2005).....	12
Figure 4 : Locus muté du gène <i>PTPLA</i> et transcrits correspondants (Pelé <i>et al.</i> , 2005).....	13
Figure 5 : Le modèle de souris <i>Hacd1</i> -KO (Blondelle <i>et al.</i> , 2015).	14
Figure 6 : Caractéristiques de la myopathie lié au gène <i>HACD1</i> chez des patients humains (Muhammad <i>et al.</i> , 2013).....	15
Figure 7 : Schéma de la myogenèse et des facteurs de différenciation associés aux différentes étapes (Le Grand et Rudnicki, 2007).....	16
Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de la fusion de 2 cellules (Sampath <i>et al.</i> , 2018).....	16
Figure 9 : Expression d' <i>Hacd1</i> dans le développement embryonnaire et son rôle dans la fusion des myoblastes (Blondelle <i>et al.</i> , 2015).....	17
Figure 10 : Evolution du poids des souris <i>Hacd1</i> -KO et des souris WT en fonction de leurs régime alimentaire (Prola <i>et al.</i> , 2021).....	18
Figure 11 : Représentation des principaux mécanisme énergétique intervenant dans le cytoplasme et la mitochondrie (Mukund et Subramaniam, 2020).....	19
Figure 12 : Augmentation de l'activité oxydative chez les souris <i>Hacd1</i> -KO par rapport aux souris WT (Prola <i>et al.</i> , 2021).....	21
Figure 13 : Composition de la membrane interne mitochondriale en cardiolipine et efficacité de la chaîne respiratoire chez les souris <i>Hacd1</i> -KO (Prola <i>et al.</i> , 2021).	21
Figure 14 : Morphologie du réseau mitochondrial dans les myofibres des souris <i>Hacd1</i> -KO (Vandestienne-Ratnam, 2021).....	22
Figure 15 : Élongation des acides gras à très longue chaîne chez les mammifères (Jakobsson <i>et al.</i> , 2006).....	23
Figure 16 : Exemple de la structure d'un sphingolipide (Posse de Chaves et Sipione, 2010).....	25
Figure 17 : Fusion de vésicules et rôle des acide gras à très longue chaîne-Sphingolipides (Molino <i>et al.</i> , 2014).....	26
Figure 18 : Interaction entre la cardiolipine et les complexes de la chaînes respiratoire mitochondriale (Paradies <i>et al.</i> , 2014).....	27
Figure 19 : Photo de différents nids réalisés par les souris femelles gestantes	42
Figure 20 : Tableau de détermination de l'âge des souriceaux, fourni par le laboratoire Jackson. .	42
Figure 21 : Tatouage des jeunes souriceaux à J4	43

Figure 22 : Poids des individus au moment de l'accouplement.	46
Figure 23 : Courbe de suivi de poids des femelles au cours de la gestation.....	48
Figure 24 : Jour moyen d'isolement des femelles.....	49
Figure 25 : Nombre de souriceaux par portée, en fonction du génotype des parents.	50
Figure 26 : Courbe de poids des souriceaux du jour 4 de lactation au jour de sevrage J28.	51
Figure 27 : Comparaison du poids des souriceaux en fonction du groupe d'étude à différents jours de lactation.....	52
Figure 28 : Courbe du poids des mères en fonction du temps au cours de l'allaitement.	53
Figure 29 : Comparaison du poids des mères en fonction du groupe d'étude au cours de la lactation.	54
Figure 30 : Poids des mères à J13 en fonction du nombre de petits par portée.	54
Figure 31 : Anabolisme absolu et relatif entre l'accouplement et le jour 13 de lactation.	56
Figure 32 : Anabolisme absolu et relatif entre le jour 4 et le jour 13 de lactation.	56
Figure 33 : Anabolisme relatif des mères en fonction du nombre de petits par portée.	57
Figure 34 : Poids des souriceaux prélevés à J9-J11 en fonction du groupe d'étude.	58
Figure 35: Glycémie des mères et des souriceaux à J9-J11.....	58
Figure 36 : Poids de différents organes de souriceaux prélevés à J9-J11.....	59
Figure 37 : Taille du tibia droit des souriceaux prélevés à J9-J11.....	60
Figure 38 : Poids des mères au sevrage en fonction de leur génotype.....	60
Figure 39 : Poids des différents organes des mères au sevrage en fonction du génotype.	61
Figure 40 : Taille du tibia droit des mères au sevrage en fonction de leur génotype.	62
Figure 41 : Pourcentage des différentes catégories d'acides gras en fonction du génotype des mères.....	63
Figure 42 : Pourcentage des différents acides gras saturés dans le lait en fonction du génotype des mères.....	63
Figure 43 : Pourcentage des différents acides gras mono-insaturés dans le lait en fonction du génotype des mères.	64
Figure 44 : Pourcentage des différents acides gras poly-insaturés dans le lait en fonction du génotype des mères.	64

Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneurs indicatives en énergie, en protéines, lipides, glucides et minéraux du lait de vache, du lait artificiel pour nourrisson et de femme (Tackoen, 2012).	30
Tableau 2 : vitamines et minéraux du lait maternel humain (Tackoen, 2012).	31
Tableau 3 : Composition du lait humain en lipides au cours du temps (D'après Jensen, 1999)	31
Tableau 4 : Composition en acide gras du lait humain en pourcentage de poids total de l'échantillon au cours du temps et en fonction de la naissance à terme ou non du nouveau-né (Jensen, 1999).	32
Tableau 5 : Composition du lait de souris (Görs <i>et al.</i> , 2009).....	33
Tableau 6 : Composition en acides gras du lait de souris nourries avec une alimentation riche en acides gras insaturés ou une alimentation riche en acides gras saturés (d'après de Peters <i>et al.</i> , 2001).....	34
Tableau 7 : Acides gras totaux (mg/g de lait) et proportion (en pourcentage) des différents acides gras présents dans le lait de souris nourries avec un régime riche en graisse face à un régime pauvre en graisse (Silverman <i>et al.</i> , 1992)	35
Tableau 8 : Liste des souris adultes utilisées au cours de l'étude	40
Tableau 9 : Liste des accouplements réalisés au cours de l'étude.	41
Tableau 10 : Suivi du poids des femelles du contact avec le mâle jusqu'à l'isolement.	47
Tableau 11 : Suivi du poids des femelles au cours de la gestation.	48
Tableau 12 : Nombre de souriceaux dans les différentes portées et composition par sexe de celles-ci.	49
Tableau 13 : Calcul de l'anabolisme chez les femelles, de l'accouplement à J13 et de J4 à J13. ...	55

Liste des abréviations

AA : acide arachidonique

ATP : adénosine 5'-triphosphate

BIN1 : *bridging integrator 1* (gène de l'amphiphysine 2)

CNM : *centronuclear myopathy* (myopathie centronucléaire)

DHA : *docosahexaenoic acid* (acide docosahexanoïque)

DNM2 : gène de la dynamine 2

ECSFA : *even-chain saturated fatty acid* (Acide gras à chaîne paires)

ELOVL 1 à 7 : *elongase of very long chain fatty acids 1 à 7*

EnvA : École nationale vétérinaire d'Alfort

EPA : *eicosapentanoic acid* (acide eicosapentaénoïque)

FADH2 : flavine adénine dinucléotide

FAS : *fatty acids synthase* (acide gras synthase)

FSH : Hormone folliculostimulante

HACD : hydroxyacyl-CoA deshydratases

KO : *knock-out*

KW : Kruskal-Wallis

LCFA : acide gras à longue chaîne

LH : hormone lutéinisante

MUFA : mono-unsaturated fatty acid (acide gras mono-insaturé)

MW : Mann-whitney

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

OCSFA : odd-chain saturated fatty acid (acide gras à chaîne impaire)

PUFA : acide gras polyinsaturé

SCD1 : stéaroyl CoA désaturase 1

SFA : *saturated fatty acid* (acide gras saturé)

SREBP-1c : *stérol régulation élément binding protéin 1-c*

VLCFA : *very long chain fatty acid* (acide gras à très longue chaîne)

WT : *Wild-type* (phénotype sauvage)

Introduction

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des maladies héréditaires qui se caractérisent à l'histologie par un nombre élevé de noyaux en position centrale dans les cellules musculaires alors que naturellement, ils sont positionnés en périphérie des cellules. Les individus atteints par ces myopathies présentent une faiblesse musculaire généralisée, pouvant aller jusqu'à des difficultés respiratoires (Jungbluth *et al.*, 2008).

Chez le chien, une CNM provoquant une myopathie proche cliniquement et histologiquement des CNM humaines a été mise en évidence dans les années 70 chez des labradors. Cela fait du chien un modèle intéressant pour l'étude des myopathies humaines (Kramer *et al.*, 1976).

En 2005, des études ont mené à l'identification de la mutation du gène responsable de cette CNM du labrador. Ce gène est alors renommé *PTPLA* et il est situé sur le chromosome 2 du chien (Pelé *et al.*, 2005). Il a ensuite été mis en évidence que cette protéine est une hydroxyacyl-CoA déshydratase (HACD) et le gène a donc été renommé *HACD1*, qui a un rôle dans l'élongation des acides gras à très longue chaîne (VLCFA) (Ikeda *et al.*, 2008).

Les VLCFA ont des rôles multiples dans l'organisme, notamment dans la composition de la membrane plasmique, dans le métabolisme énergétique mais aussi dans la composition des lipides du lait. De plus, il a été mis en évidence chez les souris *Hacd1-KO* un défaut métabolique de production d'adénosine 5'-triphosphate (ATP) et une résistance à l'obésité (Prola *et al.*, 2021). Nous nous sommes donc demandé quel était l'effet de la mutation du gène *HACD1* sur la composition en lipides du lait, et quelles pourraient en être les conséquences sur la gestation et la lactation qui sont des événements très demandeurs en énergie.

Pour cela, nous avons étudié la gestation et la lactation chez des souris mutées pour le gène *Hacd1*, au sein du laboratoire de biologie du Système neuromusculaire, dans le groupe 3 : « génétique fonctionnelle et médicale ». Pour cela nous avons suivi le poids des souriceaux et des femelles, ainsi qu'une étude lipidomique du lait des femelles mutantes et des femelles contrôles en collaboration avec la plateforme MetaToul de l'Inserm de Toulouse.

Première partie : bibliographie

1. Les myopathies

A. Les myopathies centronucléaires chez l'humain

Les myopathies centronucléaires (CNM) sont des maladies héréditaires qui se caractérisent à l'histologie par un nombre élevé de noyaux en position centrale dans les cellules musculaires. Il en existe différents types, les CNM liées à l'X et les CNM autosomiques dominantes ou autosomiques récessives. On parle aussi parfois de myopathie myotubulaire car les fibres musculaires atteintes ont une apparence de fibres musculaires fœtales, mais ce terme est uniquement utilisé pour la CNM liée à l'X (Jungbluth *et al.*, 2008). Des études menées en Irlande et en Suède montrent qu'environ 3 à 5 enfants en bas âge sur 100 000 seraient atteints d'une myopathie congénitale. Ce chiffre est sûrement sous-estimé car certaines maladies génétiques musculaires ne montrent encore aucun signe clinique ou histologique à ces âges, ce qui en fait des maladies assez fréquentes parmi les maladies rares dans les populations humaines (Hughes *et al.*, 1996) (Darin et Tulinius, 2000). Les signes cliniques sont très variables et dépendent de la mutation qui touche le patient (Jungbluth *et al.*, 2008).

a. La myopathie centronucléaire liée à l'X

La CNM liée à l'X est due à une mutation du gène de la myotubularine 1 présent sur le chromosome X. Seuls les hommes développent des signes cliniques, les femmes porteuses de la mutation sont en majorités asymptomatiques. La myotubularine est une phosphatase qui déphosphoryle des phosphatidylinositides qui sont des molécules impliquées dans de nombreux processus physiologiques comme la prolifération cellulaire, la motilité et la régulation du cytosquelette et des vésicules. L'atteinte est souvent sévère avec une forte faiblesse et une hypotonie musculaire, une ophtalmoplégie et des problèmes respiratoires dus à une atteinte du diaphragme nécessitant la mise en place d'une assistance respiratoire. L'évolution est fatale dans la majorité des cas pendant les premiers mois de la vie (Jungbluth *et al.*, 2008).

b. Les myopathies centronucléaires autosomiques dominantes

Les formes autosomiques dominantes sont majoritairement dues à des mutations gain de fonction du gène de la dynamine 2 (*DNM2*) qui se trouve sur le chromosome 19 (Bitoun *et al.*, 2005). La *DNM2* est une protéine de la membrane plasmique de la famille des dynamines, qui sont des GTPases, elles jouent un rôle dans la formation des tubules T dans le muscles et dans le transport des vésicules cytoplasmique (Perdreau-Dahl *et al.*, 2023)(Artalejo *et al.*, 2002). La mutation du gène *DNM2* peut aussi provoquer une forme intermédiaire de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, une maladie touchant les axones des nerfs périphériques (Zhao *et al.*, 2018).

Les symptômes présentés sont variables en fonction de la partie du gène atteinte par la mutation. Les patients montrent des signes de faiblesses musculaire qui apparaissent à l'adolescence et une évolution jusqu'à la perte de la mobilité autonome. On a d'abord une atteinte musculaire distale, en particulier sur les membres inférieurs puis une atteinte proximale (Jungbluth *et al.*, 2008). Les études histologiques montrent une centralisation nucléaire, une hypotrophie des fibres et une prédominance des fibres de type I (Bitoun *et al.*, 2005).

Il existe aussi un cas de CNM autosomique dominante dû à une mutation du gène du récepteur à la ryanodine du muscle squelettique qui a été décrit, avec comme signes cliniques une atteinte oculaire, une faiblesse musculaire généralisée et une insuffisance cardiaque et respiratoire modérée (Jungbluth *et al.*, 2007).

c. Les myopathies centronucléaires autosomiques récessives

Les CNM autosomiques récessives sont en partie dues à la mutation du gène de l'amphiphysine 2 (*Bin1*). Les patients présentent une faiblesse musculaire surtout proximale et faciale, en particulier des muscles masticateurs, une ophtalmoplégie externe, un ptosis et des troubles respiratoires qui ne nécessitent pas une prise en charge médicale. C'est une forme intermédiaire entre les CNM autosomique dominante et la CNM liée à l'X (Jungbluth *et al.*, 2008).

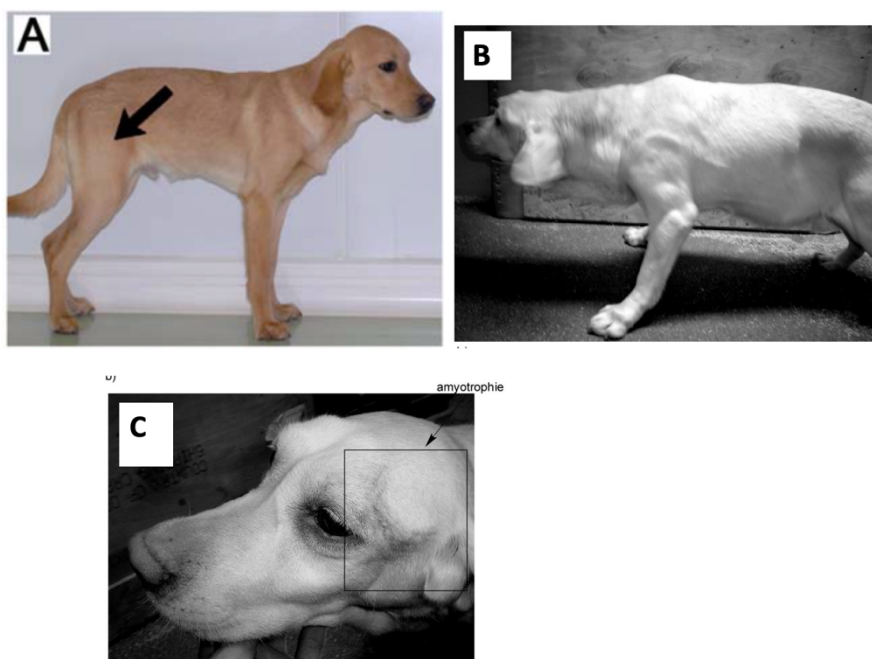
B. Les myopathies centronucléaires chez le chien

a. Description des myopathies chez le chien

Il a été décrit, pour la première fois dans les années 70 chez des labradors retrievers de moins de 6 mois, une maladie spontanée dont l'évolution et l'histologie du muscle ressemblent à celles de la CNM humaine de forme autosomique. L'étude des pedigrees laissait suspecter une étiologie génétique (Kramer *et al.*, 1976). Les recherches suivantes ont montré que cette maladie était bien génétique et qu'elle était due à une mutation autosomique récessive (Kramer *et al.*, 1981)(Bley *et al.*, 2002). On observe une démarche maladroite, une diminution de la tolérance à l'effort associée à une faiblesse musculaire généralisée. La gravité des signes cliniques et l'âge d'apparition est assez variable mais l'évolution clinique se stabilise vers 1 an (McKerrell et Braund, 1987). Chez le chien adulte, on observe en particulier l'atrophie des muscles temporaux, cervicaux et des membres postérieurs entraînant une augmentation du polygone de sustentation (Figure 1). Les muscles sont non douloureux à la palpation, on observe une démarche sautillante, raide et une intolérance à l'exercice (Tiret *et al.*, 2003).

Figure 1 : Principaux signes cliniques retrouvés chez les labradors atteints de la myopathie centronucléaire liée à *HACD1* (Maurer *et al.*, 2012).

A. Hypotrophie du biceps fémoral. **B.** Augmentation du polygone de sustentation. **C.** Amyotrophie des muscles temporaux.

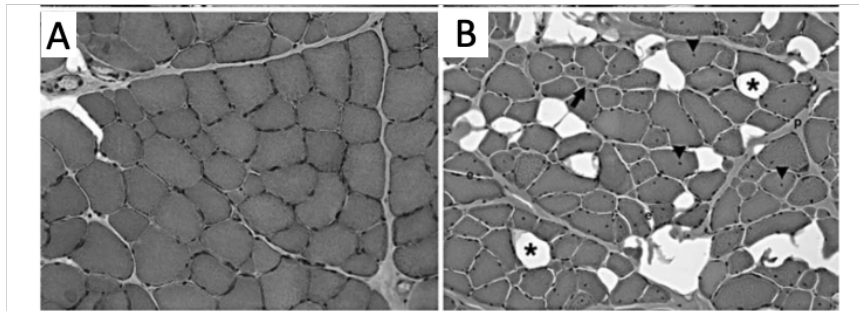


On observe dans certains cas un méga-œsophage détectable radiologiquement (McKerrell et Braund, 1987). Malgré ce que semblaient montrer les premiers cas observés (Kramer *et al.*, 1976), les nouvelles recherches démontrent qu'aucune modification de la concentration sérique de créatine kinase n'est observée (Tiret *et al.*, 2003). À l'électromyogramme, on observe des ondes nettes

positives, des potentiels de fibrillation et des décharges anormales à hautes fréquences, mais des vitesses de conduction nerveuse dans les valeurs normales (Moore *et al.*, 1987). L'histopathologie est la méthode de confirmation de choix de la CNM. Les biopsies musculaires et leurs analyses histopathologiques réalisées sur les muscles des chiens atteints révèlent un remodelage et une hétérogénéité précoce de la forme et de la taille des myofibres (Figure 2).

Figure 2 : Coupes histologiques transversales de biceps fémoral de chien atteint de la myopathie centronucléaire lié à *HACD1*, coloration hémalun-éosine (Tiret *et al.*, 2003).

Coupe transversale d'un biceps fémoral chez un labrador de 3 mois sain (A) et chez son frère atteint (B). On observe la répartition des noyaux en périphérie sur la coupe (A) et parfois en position centrale sur la coupe (B, tête de flèches).



Chez les chiens sains, le rapport entre fibres de type II et fibres de type I dans le biceps fémoral est de 60/40 alors que chez les chiens atteints, on observe un rapport de 10/90, donc une prédominance des fibres lentes de type I (Tiret *et al.*, 2003). On observe une hypotrophie des fibres de type I et de type II, avec le remplacement des fibres par un tissu adipeux et fibreux désorganisé. Le diamètre moyen des fibres mesuré en histologie est réduit de 22 à 30% et la distribution globale des diamètres des fibres est déplacée vers des valeurs plus petites par rapport aux chiens sains (Blondelle *et al.*, 2015). On observe aussi une centralisation des noyaux dans près de 60% des fibres chez les chiens de plus de 7 ans ainsi qu'une agrégation mitochondriale et une réorganisation du réseau intermyofibrillaire. L'examen histologique du système nerveux central des chiens affectés ne révèle aucune différence avec celui des chiens sains (Tiret *et al.*, 2003).

Actuellement, la CNM du labrador est le seul modèle spontané animal de myopathie centronucléaire autosomique, ce qui en fait un très bon modèle pour l'étude de la pathogenèse des CNM (Blot *et al.*, 2002). Les chiens sont normaux à la naissance, puis montrent rapidement des signes de faiblesse et d'hypotrophie musculaire. Les signes histologiques chez le chien et l'humain sont très semblables. Il a aussi été mis en évidence chez des labradors appelé myopathie myotubulaire, liée à des mutations du gène de la myotubularine 1, comme pour la myopathie liée à l'X chez l'humain (Beggs *et al.*, 2010). Il existe enfin chez les dogues allemands une myopathie spontanée assez similaire à la CNM autosomiques récessive due à la mutation de *BIN1* chez l'humain. La maladie est progressive, les signes cliniques apparaissent vers 10 mois, évoluent rapidement vers la nécessité d'une euthanasie de l'animal en raison de la faiblesse musculaire sévère. À l'histologie, on constate des muscles avec beaucoup de fibre de type I et des zones dépourvues de myofibrilles avec une accumulation centrale des mitochondries. cette myopathie est due à une mutation du gène *BIN1* chez les chiens aussi (Feliu-Pascual *et al.*, 2006)(Böhm *et al.*, 2013).

Nous nous intéresserons par la suite uniquement à la myopathie Centronucléaire autosomique lié au gène *HACD1* touchant les labradors.

b. Mise en évidence de la mutation responsable de la CMN autosomique canine

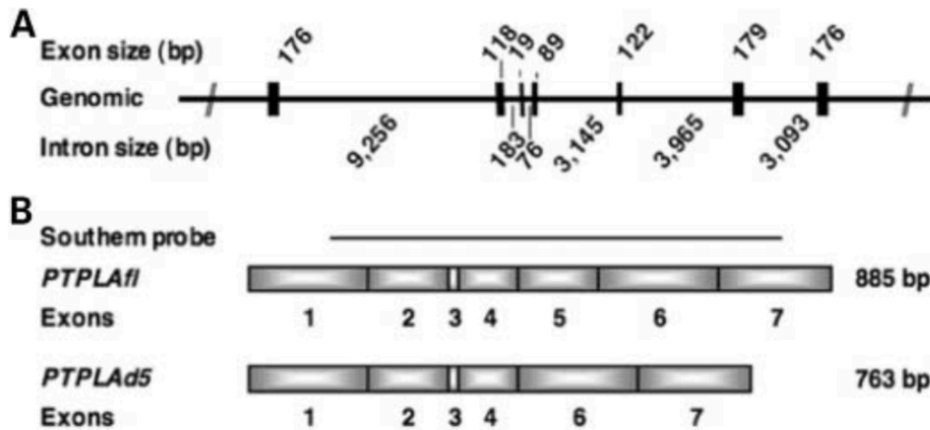
Cette mutation présente un mode de transmission autosomique récessif à pénétrance complète (Tiret *et al.*, 2003). Le locus de la mutation appelé *cnm* a été mis en évidence en 2003 à l'école nationale vétérinaire d'Alfort (EnvA) par les équipes des professeurs Laurent Tiret et Stéphane Blot.

Ce locus a été identifié sur le chromosome 2, dans une région centrométrique appelée CAF2. Des études ont mené en 2005 à l'identification sur ce locus du gène *PTPLA* (*protein tyrosine phosphatase like A*) (Pelé et al., 2005).

Dans les muscles squelettiques, il existe deux isoformes de transcrit de *PTPLA*, par épissage différentiel de l'exon 5. On parle donc de l'isoforme pleine longueur *PTPLAfl* qui contient l'exon 5 et de l'isoforme avec l'exon 5 excisé *PTPLAd5* (Figure 3) (Pelé et al., 2005).

Figure 3 : *PTPLA* et ses transcrits (Pelé et al., 2005).

A. Carte des introns et des exons du gène *PTPLA* **B.** Présentation des deux transcrits *PTPLAfl* et *PTPLAd5* et leur longueur en paires de bases.

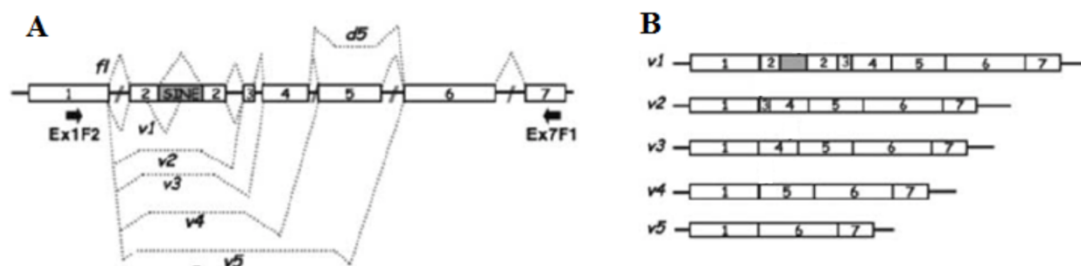


Les deux protéines obtenues sont appelées respectivement *PTPLAFL* et *PTPLAD5*. Elles ont un domaine N-terminal commun et des domaines C-terminaux différents. Le transcrit *PTPLAFL* code une protéine de 249 acides aminés formée de quatre domaines transmembranaires. L'absence de l'exon 5 dans l'isoforme *PTPLAD5* provoque une terminaison prématurée de la traduction et la protéine obtenue ne contient que deux domaines transmembranaires et le site catalytique (Pelé et al., 2005).

On retrouve dans l'ADN génomique des chiens *cnm*^{-/+} et des chiens *cnm*^{-/-} un *short interspersed repetitive elements (SINE)* de type rétrotransposon de 236 paires de bases. Cette mutation est dénommée *PTPLAalf*. Cette insertion SINE conduit à un épissage aberrant, donnant chez les chiens *cnm*^{-/-} comme transcrit les isoformes *PTPLAfl* et *PTPLAd5* identiques à celles présentes chez les chiens *cnm*^{+/+} et 5 transcrits aberrants appelé V1, V2, V3, V4 et V5 (Figure 4) (Pelé et al., 2005).

Figure 4 : Locus muté du gène *PTPLA* et transcrits correspondants (Pelé *et al.*, 2005).

A. Visualisation de l'insertion SINE dans l'exon 2 de *PTPLA**fl* **B.** Présentation des 5 transcrits aberrants qui en découlent, nommés *v1* à *v5*.



Les transcrits *PTPLA**fl* et *PTPLA**d5* conduisent bien à la production des protéines *PTPLA**FL* et *PTPLA**D5*, tandis que les variants *V1* à *V5* conduisent à des formes tronquées de *PTPLA*. Les transcrits *wild type* (WT) *PTPLA**fl* et *PTPLA**d5* représentent chez les chiens atteints par la mutation 1% de la totalité des transcrits (Pelé *et al.*, 2005).

Il a été montré en 2012 que tous les labradors atteints de cette maladie portaient bien cet allèle perte de fonction de *PTPLA* dû à la présence de la séquence SINE suggérant une origine commune pour cette maladie (Maurer *et al.*, 2012).

C. La myopathie autosomique récessive liée à *HACD1*

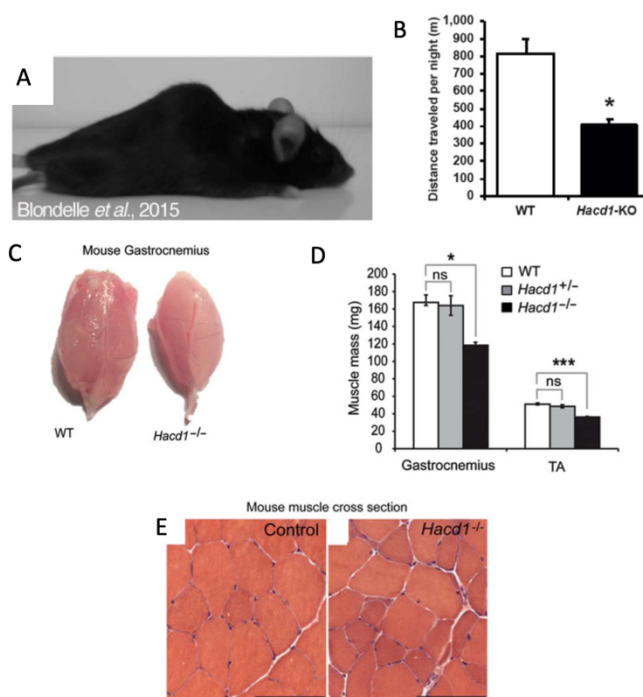
a. Identification de la fonction du gène *HACD1*

Les protéines *PTPLA* et *PTPLB* des mammifères ont de nombreuses similitudes avec la protéine de la levure *Phs1* codée par le gène *phs1* (Ikeda *et al.*, 2008). Chez la levure, il a été mis en évidence que ce gène *phs1* intervient dans le cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne (VLCSFA) et code une hydroxyacyl-CoA déshydratase (*HACD*) (Denic et Weissman, 2007). Il a été démontré que les protéines *PTPLA* et *PTPLB* sont des homologues de fonction de *Phs1*, ce sont donc les 3-hydroxyacyl-CoA déshydratases des mammifères. Les protéines *PTPLA* et *PTPLB* ont donc été renommées *HACD1* et *HACD2* et de même, les deux isoformes de *PTPLA*, *PTPLA**d5* et *PTPLA**fl* ont été renommées respectivement *HACD1**d5* et *HACD1**fl*. D'autres études ont montré l'existence chez les mammifères de protéines appelées *PTPLAD1* et *PTPLAD2* qui ont des homologies avec *HACD1* et *HACD2* et qui ont aussi une action *HACD*, elles sont donc renommées respectivement *HACD3* et *HACD4*. Ces quatre *HACD* sont localisées dans le réticulum endoplasmique (Ikeda *et al.*, 2008).

La lignée murine knock-out (KO) pour le gène *Hacd1* appelée lignée *Hacd1*-KO est une lignée de laboratoire créée par excision des exons 2, 3 et 4 sur le locus *Hacd1*. Les embryons homozygotes déficients en *Hacd1* se développent normalement, naissent et deviennent des souriceaux avec une croissance squelettique normale, avérée par une longueur du tibia identique aux animaux *Hacd1*-WT et *Hacd1* hétérozygotes. Les souris *Hacd1*-KO présentent une croissance et une fertilité normale mais un phénotype de myopathie congénitale avec réduction du diamètre des fibres mais rarement une centralisation des noyaux. Elles présentent une masse musculaire diminuée de 30% environ par rapport au phénotype sauvage et une diminution de l'activité locomotrice spontanée, associée parfois tardivement à une cyphose (Figure 5) (Blondelle *et al.*, 2015). Tout cela fait de cette lignée un bon moyen d'étude de la myopathie liée au gène *HACD1*.

Figure 5 : Le modèle de souris *Hacd1*-KO (Blondelle *et al.*, 2015).

A. Photo d'une souris *Hacd1*-KO. **B.** Activité locomotrice spontanée des souris WT 2 fois plus élevée que celle des souris *Hacd1*-KO du même âge, **C.** Réduction du volume musculaire associé **D.** Réduction significative de la masse musculaire du gastrocnémien et du tibial antérieur **E.** Coupe transversale des muscles montrant une réduction du diamètre des fibres chez la souris *Hacd1*-KO.



In vitro, dans les cellules musculaires des souris mutantes pour *Hacd1*, le rapport des acides gras C18-C26/C10-16 est plus faible que dans les cellules contrôles confirmant le rôle d'HACD1 dans le cycle d'élongation des VLCFA, le C18 étant l'acide gras le plus petit synthétisé par le complexe d'élongation des VLCFA (Blondelle *et al.*, 2015).

b. Myopathie par mutation du gène *HACD1* chez l'humain.

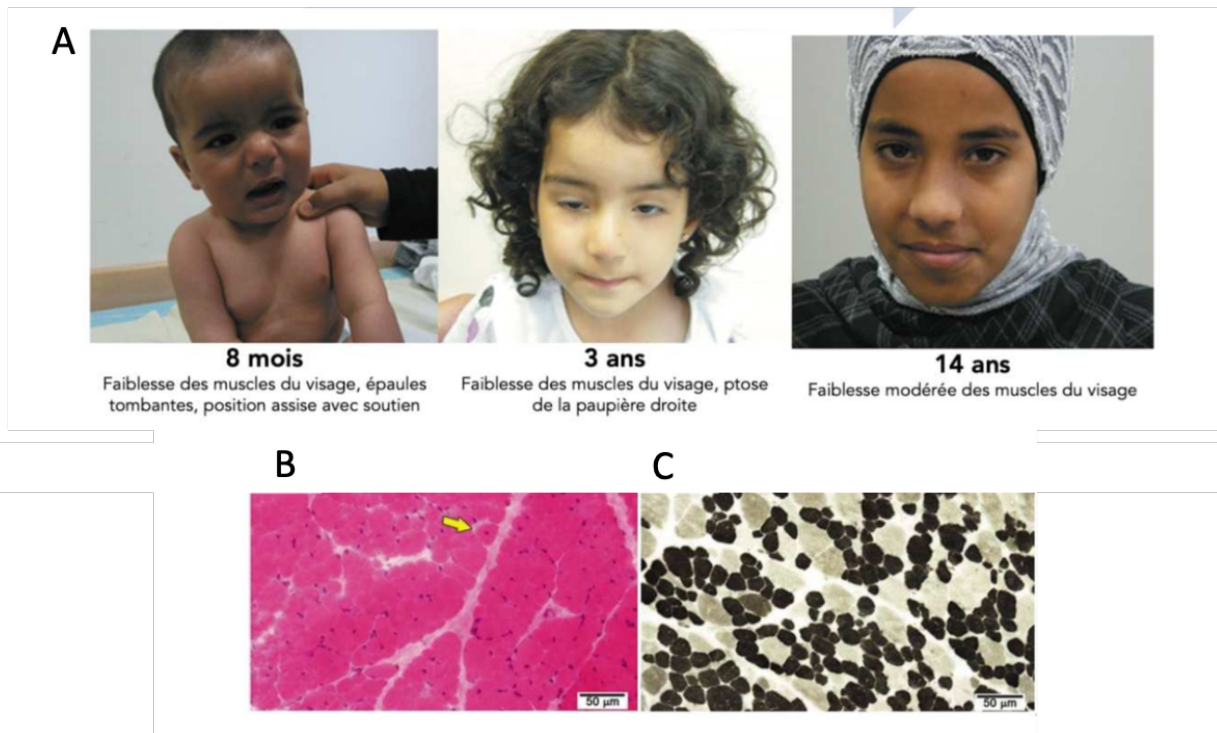
Chez l'humain le gène *HACD1* est exprimée dans le cœur et dans les muscles squelettiques alors que *HACD2* est ubiquitaire. *HACD3* est aussi ubiquitaire mais fortement exprimé dans le cerveau, les reins et le foie. *HACD4* s'exprime fortement uniquement dans les leucocytes (Ikeda *et al.*, 2008). Il a d'abord été mis en évidence des cas de myopathie, dans une famille avec un fort taux de consanguinité d'ascendance bédouine, dus à une mutation non-sens d'*HACD1* à l'état homozygote, provoquant une perte de fonction d'*HACD1* (Muhammad *et al.*, 2013). Ensuite, une mutation perte de fonction d'*HACD1* a été mis en évidence chez une famille caucasienne à fort taux de consanguinité, entraînant à l'état homozygote une myopathie similaire (Toscano *et al.*, 2017). Puis une autre mutation entraînant une myopathie à l'état homozygote, par insertion d'un élément long de 1250 paires de base environ dans l'exon 6 du gène *HACD1* a été mise en évidence dans une famille du Sri-Lanka (Al Amrani *et al.*, 2020). Des mutations non-sens du gène *HACD1* à l'origine d'une myopathie à l'état homozygote ont aussi été mises en évidence dans une famille iranienne, une famille des Emirats arabes Unis et une famille d'Arabie Saoudite, toutes trois présentant des taux de consanguinité élevés (Abbasi-Moheb *et al.*, 2021). Enfin en 2023, dans une famille Irano-turque à fort taux de consanguinité, une mutation non-sens du gène *HACD1* à l'origine d'une myopathie à l'état homozygote a été identifiée (Jabbarpour *et al.*, 2023).

En tout, six variants du gènes *HACD1* ont donc été mis en évidence dans des familles à fort taux de consanguinité provoquant une mutation perte de fonction du gène *HACD1*. Dans tous les cas, les patients présentaient une myopathie dès leur jeune âge, se traduisant par une forte hypotonie, une absence de réflexe tendineux, ainsi qu'une difficulté à se nourrir. Ces signes

précoces sont très proches de ceux retrouvés chez les chiots atteints de CNM. Les enfants présentent ensuite des difficultés à se tenir debout, un retard de la mise en place de la marche et une atteinte des muscles du visage (Figure 6).

Figure 6 : Caractéristiques de la myopathie lié au gène *HACD1* chez des patients humains (Muhammad *et al.*, 2013).

A. Présentation des principaux signes cliniques touchant les enfants atteints. **B.** Coupe de quadriceps à un an montrant un noyau centralisé dans une petite fibre en coloration Hémalum éosine. **C.** Majorité de fibres lentes de type 1 de petites tailles de couleur noire à la coloration ATPase



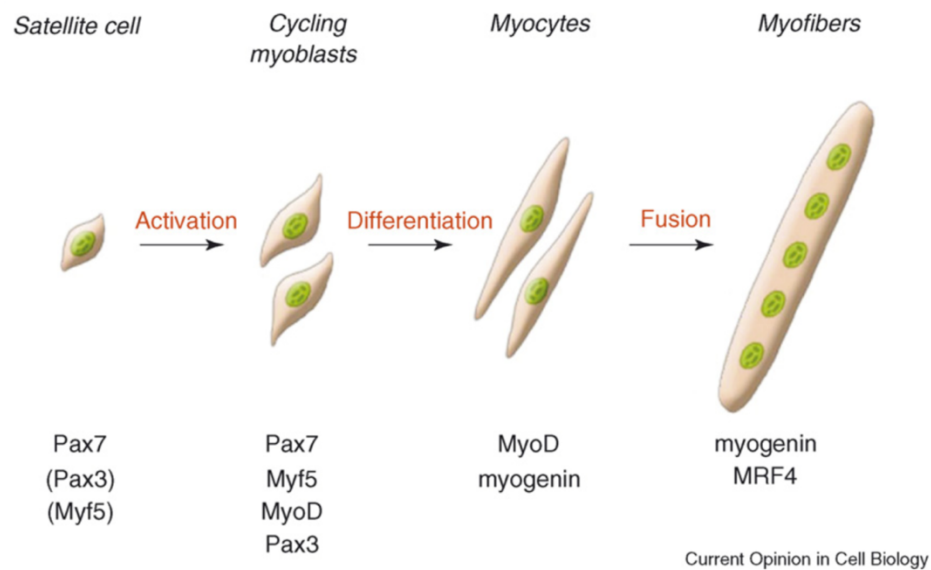
A l'histologie, les biopsies de muscle ont montré une forte variation du diamètre des fibres avec prédominance de fibres lentes de type 1 et des marquages anormaux de l'activité mitochondriale. Cependant, très peu de centralisations anormales des noyaux ont été mises en évidence (Figure 6). Compte tenu des observations chez le chien, il est possible que les biopsies réalisées en phase précoce de la maladie explique l'absence des noyaux centralisés (Muhammad *et al.*, 2013). Ces observations histologiques permettent le classement de cette maladie comme myopathie congénitale à disproportion de taille des fibres (Abbasi-Moheb *et al.*, 2021).

c. Conséquences de la mutation du gène *Hacd1* sur la fusion cellulaire

La fusion physiologique cellule-cellule chez les mammifères se produit dans plusieurs circonstances : fusion des gamètes lors de la fécondation, différenciation des ostéoclastes en cellules géantes et formation de syncytiotrophoblastes dans le placenta. La fusion intervient aussi pathologiquement via des virus, comme le VIH, ou chez les cellules tumorales (Charrin *et al.*, 2013).

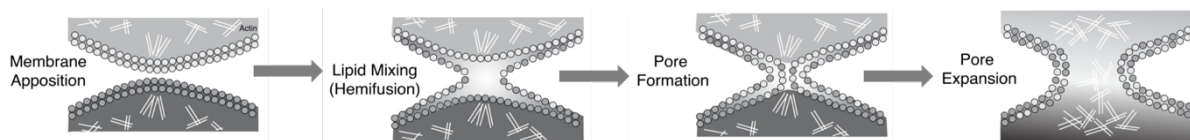
Lors du développement embryonnaire, les muscles sont générés lors de la myogenèse par le dermomyotome à partir de cellules souches grâce à l'expression de nombreux facteurs de transcription (Relaix *et al.*, 2006). Les cellules souches se différencient en une lignée myogénique, les myoblastes puis en myocytes (Figure 7). Les myocytes ont la capacité de fusionner entre eux afin de donner des cellules syncytiales appelées myotubes. Ces cellules possèdent au départ des noyaux centraux, repoussés dans un second temps à la périphérie par la formation de l'appareil contractile. Les myotubes fusionnent entre eux afin de donner les fibres musculaires finales (Le Grand et Rudnicki, 2007).

Figure 7 : Schéma de la myogenèse et des facteurs de différenciation associés aux différentes étapes (Le Grand et Rudnicki, 2007).



La fusion des myoblastes est possible grâce à des protéines fusogènes appelées Myomaker et Myomixer. Localisées dans la membrane plasmique, elles jouent un rôle essentiel dans l'adhésion cellule-cellule (Millay *et al.*, 2013)(Bi *et al.*, 2017). Les lipides sont essentiels dans cette étape de fusion qui dépend du remodelage de la membrane plasmique (Figure 8). En effet, la fusion demande que les membranes se courbent fortement, ce qui demande une composition lipidique particulière de la membrane. La souplesse de la membrane augmente grâce à l'augmentation des lipides de fusion, comme la phosphatidyléthanolamine et la diminution des lipides rigidifiants comme le cholestérol ou déstabilisants comme la lysophosphatidylcholine (Haque *et al.*, 2001).

Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de la fusion de 2 cellules (Sampath *et al.*, 2018)



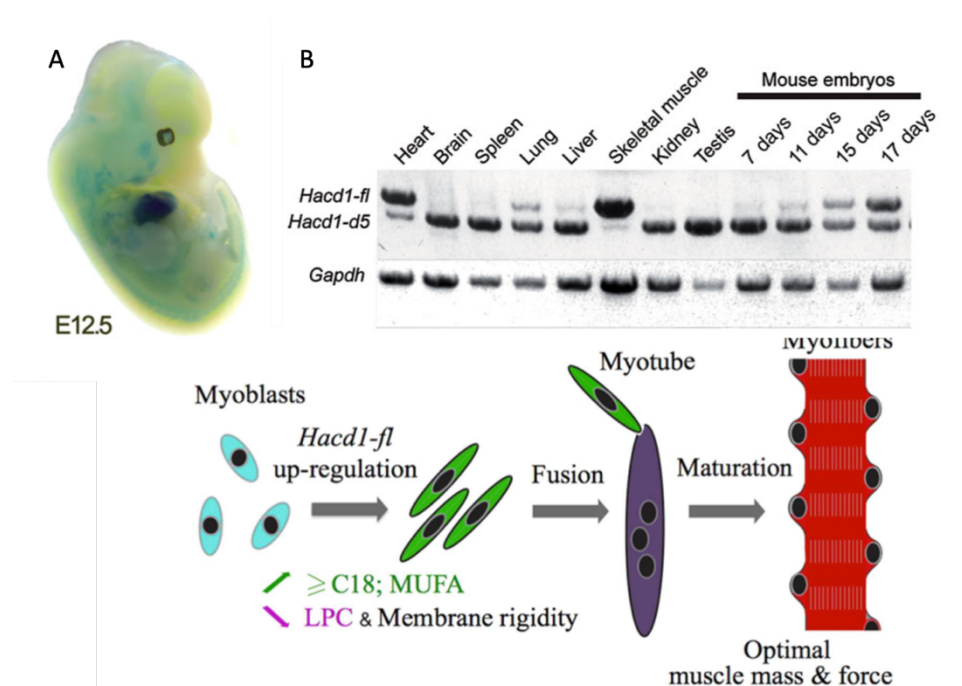
Le déficit en HADC1 est associé à une hétérogénéité précoce de la taille des myofibrilles et une centralisation nucléaire progressive (Tiret *et al.*, 2003). La fusion des myoblastes est l'étape limitante pour la croissance optimale des myofibrilles et pour leur régénération (Le Grand et Rudnicki, 2007).

Les souris *Hacd1-KO* présentent une réduction de prise de poids, en majorité due à une réduction du poids musculaire, jamais compensée à l'âge adulte, et une taille normale. Ce phénotype rappelle celui des labradors atteints de CMM *HACD1* qui présentaient une prise de poids réduite dans les premières semaines de vie puis une faiblesse posturale et locomotrice. Les souris *Hacd1-KO* présentent lors de régénération musculaire, tout comme les chiens atteints de CMM *HACD1*, des fibres musculaires hypotrophiques et une absence des grandes myofibrilles. Le nombre de cellules souches satellites est normal, ce qui exclut un déficit de ces cellules comme cause de l'hypotrophie. De même chez les souris *Hacd1-KO*, les myoblastes se différencient très bien en myotubes. Tout cela montre que l'hypotrophie des fibres est due à un déficit de fusion des myoblastes sans anomalie de ceux-ci. Cela suggère qu'*Hacd1* est essentiel dans la fusion des myoblastes (Blondelle *et al.*, 2015).

L'isoforme *Hacd1d5* est présente dans tous les tissus alors que *Hacd1fl* est présente en majorité dans les muscles squelettiques et le cœur et en grande quantité pendant le développement embryonnaire, en particulier sur la période de développement musculaire, notamment de fusion des myofibres (Figure 9). De même, on observe une prédominance d'*Hacd1fl* sur *Hacd1d5* dans les muscles lors de la régénération. Aucun changement d'expression d'*Hacd2* et *Hacd3* pendant ces périodes dans les muscles n'est observé. In vitro, il a été montré que seul *Hacd1fl* donne une protéine avec une activité enzymatique active et qu'*HACD1-fl* est essentiel pour la fusion des myoblastes, or *HACD1-fl* ne représente que 1% des transcrit chez les chiens myopathes (Blondelle *et al.*, 2015).

Figure 9 : Expression d'*Hacd1* dans le développement embryonnaire et son rôle dans la fusion des myoblastes (Blondelle *et al.*, 2015).

A. Expression d'*Hacd1* dans un embryon hétérozygote pour *Hacd1* de 12 jours révélée par une coloration bleue. **B.** RT-PCR montrant l'expression des transcrits d'*Hacd1*. **C.** Modèle du rôle d'*HACD1fl* dans la fusion des myoblastes.



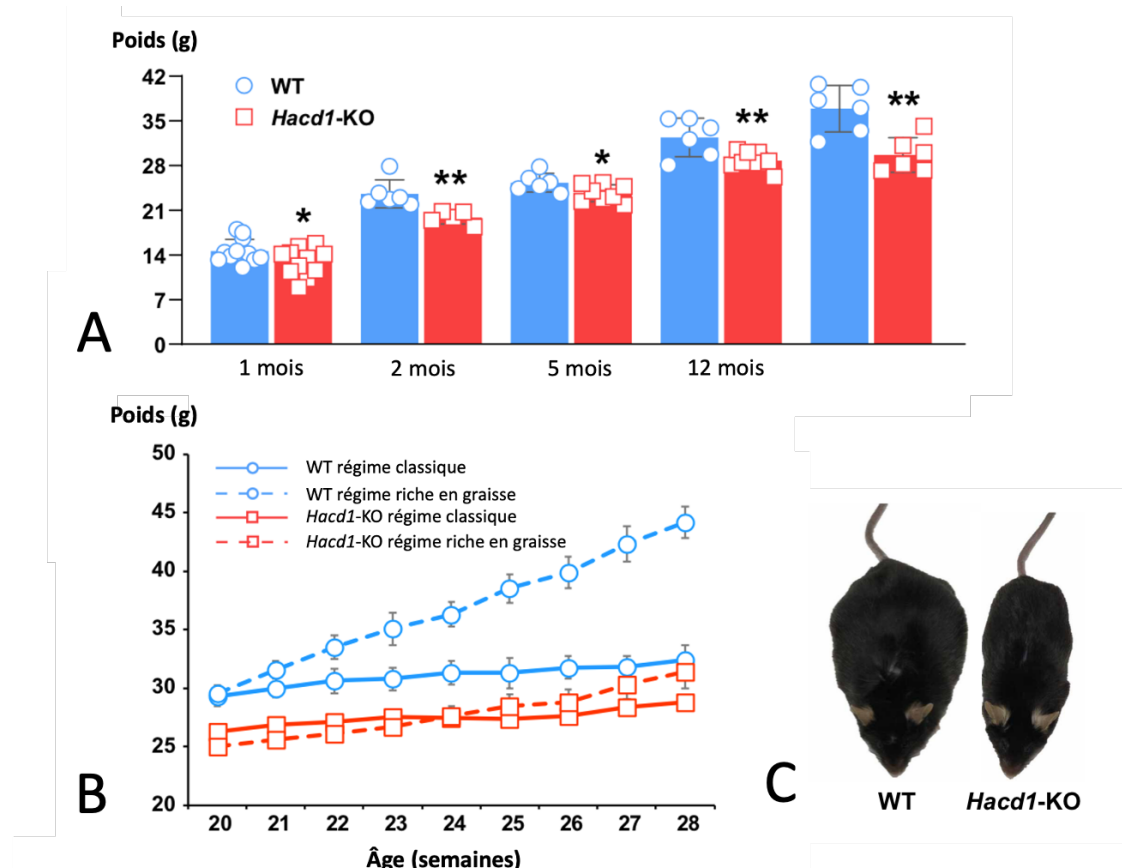
Comme *HACD1fl* intervient dans l'élongation des VLCFA, l'augmentation du rapport *HACD1-fl*/*HACD1-d5* s'accompagne aussi d'une augmentation du rapport C18-C26/C10-16. De plus *HACD1* favorise la synthèse des acides gras monoinsaturés (MUFA) au détriment des acides gras saturés (SFA) et conduit à une baisse de la rigidité membranaire. L'activité *HACD1* induit une chute du contenu en lysophosphatidylcholine qui est connue pour être un inhibiteur de la fusion des myoblastes. L'expression d'*Hacd1* ayant un rôle positif dans la fusion des myoblastes cela explique l'hypotrophie musculaire chez les patients atteints de la myopathie liée à *HACD1* et les souris *Hacd1-KO* (Blondelle *et al.*, 2015).

d. Conséquences de la mutation du gène *Hacd1* sur le métabolisme

Les souris *Hacd1-KO* présentent, en plus d'avoir une réduction précoce de la masse musculaire, une faible capacité à prendre du poids, malgré leur plus faible activité locomotrice spontanée. Lorsqu'on met en place un régime riche en graisse (*High fat diet*), il a été observé que les souris *Hacd1-KO* sont protégées de l'obésité par rapport aux souris WT, malgré une consommation alimentaire identique (Figure 10).

Figure 10 : Evolution du poids des souris *Hacd1*-KO et des souris WT en fonction de leurs régime alimentaire (Prola *et al.*, 2021).

A-B. Évolution du poids des souris *Hacd1*-KO et des souris WT avec un régime alimentaire classique (A) puis comparaison avec un régime riche en graisse C. Comparaison d'une souris *Hacd1*-KO et d'une souris WT après 9 semaines de régime riche en graisse.



Il a aussi été montré une augmentation modérée chez les souris *Hacd1*-KO de la quantité de tissu adipeux par rapport aux souris WT sous régime riche en graisse, ainsi que moins de cas de stéatose hépatique. La quantité de lipides étant identique dans les fèces des deux groupes de souris et la quantité d'aliment consommée identique, seule une augmentation de la dépense énergétique expliquait la résistance à l'obésité des souris *Hacd1*-KO (Prola *et al.*, 2021).

Les études calorimétriques indirectes montrent que les souris *Hacd1*-KO ont une augmentation globale du métabolisme par rapport aux souris WT malgré leur faible masse musculaire. Cette augmentation du métabolisme est aussi observée chez les souris *Hacd1*-KO nourries avec un régime alimentaire classique. Il existe donc chez les souris *Hacd1*-KO un mécanisme énergétique qui utilise les nutriments normalement stockés chez les individus sains. Le muscle représentant une grande partie de la dépense énergétique de l'organisme et étant le siège de la synthèse de l'isoforme active d'*Hacd1*, il a été suspecté que le muscle soit impliqué dans ce phénotype métabolique particulier des souris *Hacd1*-KO (Prola *et al.*, 2021).

Dans l'organisme, la production d'énergie basale repose sur la fonction mitochondriale assurant la production d'ATP à partir de substrats énergétiques, qui se déroule dans la membrane mitochondriale interne. La mitochondrie utilise majoritairement comme source d'énergie le pyruvate, dérivé du glucose ou les acides gras (Hall et Hall, 2020).

Les premiers substrats, les glucides, sont oxydés dans un mécanisme anaérobie dépendant de l'ATP, permettant de produire, 2 ATP, 2 pyruvates et 2 nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Puis le pyruvate est utilisé dans un mécanisme aérobie par la mitochondrie pour produire

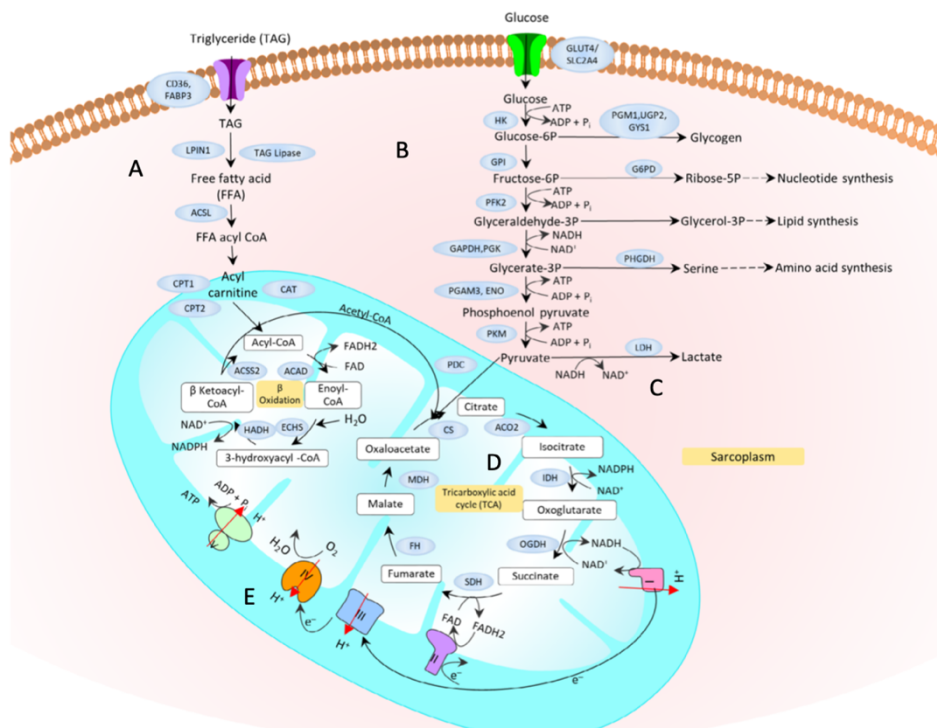
du CO₂, un NADH et un acétyl-CoA qui entre ensuite dans le cycle de Krebs, permettant la production de substrats énergétiques NADH et FADH₂ qui dans la chaîne respiratoire mitochondriale permettront la production d'ATP (Figure 11) (Hall et Hall, 2020). En cas de manque d'oxygène, le muscle est capable de produire à partir d'un pyruvate de l'acide lactique, et au cours de cette réaction appelée fermentation, le NADH redevient un NAD⁺ permettant de faire fonctionner la glycolyse anaérobie. Ce mécanisme est utile en cas de manque d'oxygène ou de mitochondrie déficiente mais il est limité dans le temps car l'accumulation de l'acide lactique empêche rapidement le fonctionnement musculaire par acidification (Mukund et Subramaniam, 2020).

Les deuxièmes substrats, les acides gras, permettent au cours de la bêta-oxydation un meilleur rendement en ATP mais c'est un mécanisme plus lent. Chaque cycle de bêta-oxydation permet la production d'un acétyl-CoA destiné au cycle de Krebs, d'un NADH⁺ et d'un FADH₂ (Figure 11). Le passage d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif des acides gras permet un meilleur rendement des mitochondries (Hall et Hall, 2020).

Les NADH et FADH₂ sont ensuite utilisés par la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Présente dans la membrane interne de la mitochondrie, la chaîne respiratoire permet suite à un transport d'électrons et une série de phosphorylations oxydatives, la mise en place d'un gradient de protons et la production d'ATP grâce à l'ATP synthase (Hall et Hall, 2020). La membrane interne de la mitochondrie a une composition particulière, elle contient notamment de la **cardiolipine**, un phospholipide spécifique qui favorise le repliement des crêtes et la fonction de l'ATP synthase (Prola *et al.*, 2021). Toute baisse de productivité en synthèse d'ATP entraîne une augmentation de l'utilisation des substrats énergétiques (Tseng *et al.*, 2010).

Figure 11 : Représentation des principaux mécanismes énergétiques intervenant dans le cytoplasme et la mitochondrie (Mukund et Subramaniam, 2020).

A. Schéma de la bêta-oxydation **B.** La glycolyse permet de produire de l'acétyl-CoA. **D.** Le cycle de Krebs produit des coenzyme pour la production d'ATP **E.** La chaîne respiratoire de la mitochondrie. **C.** Voie alternative en cas de manque d'oxygène, la fermentation.



L'organisation même du muscle est faite pour optimiser la production d'énergie. La contraction musculaire est dépendante de l'ATP, elle demande donc une production continue et

importante en énergie par la cellule musculaire. Il existe différents types de fibres musculaires. Les fibres lentes oxydatives (type I) plus présentes dans les muscles résistants à la fatigue comme les muscles de la posture. Leur mécanisme repose sur un métabolisme lent mais très productif, utilisant les acides gras comme substrat. On retrouve également une forte densité mitochondriale dans ces fibres. Les fibres rapides glycolytiques (Type IIb) génèrent une activité intense mais de courte durée. Elles reposent sur un mécanisme glycolytique avec production d'acide lactique. Les fibres rapides oxydatives (type IIa) sont des fibres intermédiaires, produisant rapidement beaucoup d'énergie mais sur une courte durée. Les mitochondries peuvent orienter leur source de substrat en fonction de la disponibilité de ce dernier et de la demande énergétique du muscle (Rome *et al.*, 1988). Chez les humains atteints de myopathie liée au gène *hACD1*, on retrouve à l'histologie une plus grande proportion de fibres lentes de type I.

Dans la cellule musculaire, les mitochondries sont situées à deux endroits : 25 % près de la membrane plasmique et 75% en position intermyofibrillaires, ces dernières étant sûrement les plus grandes productrices d'ATP pour les myofibrilles (Mukund et Subramaniam, 2020).

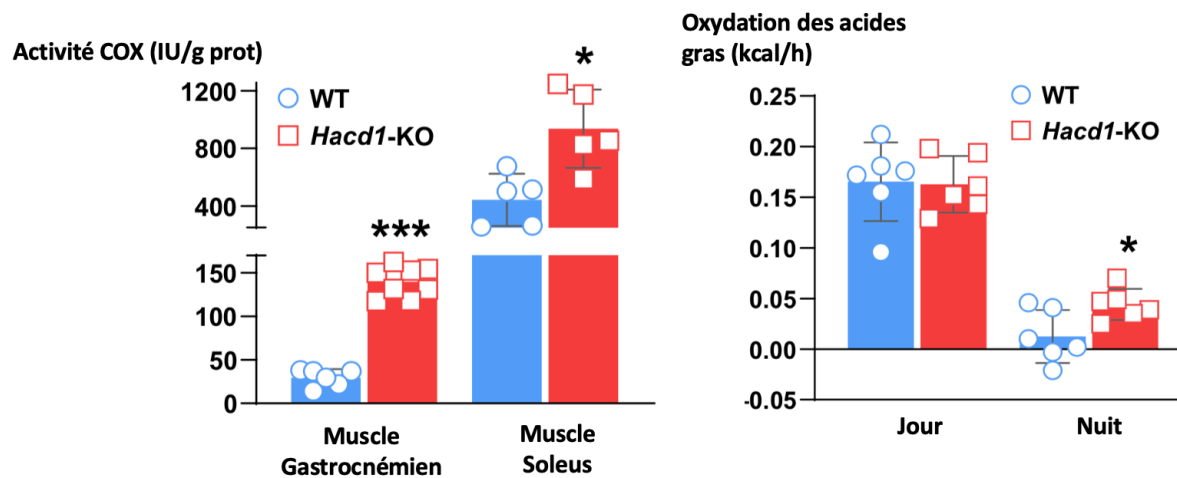
Chaque cellule possède une quantité variable de mitochondries en fonction du type cellulaire, et cette quantité est modulable en fonction des différentes situations physiopathologiques (Akimoto *et al.*, 2005). Chaque nouvelle mitochondrie résulte d'une croissance de la masse mitochondriale puis de son éventuelle division. Cette biosynthèse mitochondriale est principalement due à une protéine, la *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha* (Adihetty *et al.*, 2009). Son expression est essentielle pour les tissus à forte capacité oxydative comme les muscles et son inactivation expérimentale chez la souris provoque un changement des fibres de type I et IIa vers des fibres IIb-like avec de nombreuses fibres endommagées conduisant à une perte d'endurance (Handschin *et al.*, 2007).

La microscopie a permis de montrer que les mitochondries sont des organites très dynamiques, formant un réseau régi par des événements de fusion et fission. Les mitochondries fusionnent grâce aux mitofusines MFN1 et MFN2 et la protéine dynamin-like OPA1. La fission est favorisée par les protéines appelées *dynamin-related protein 1* et *mitochondrial fission factor* (Pernas et Scorrano, 2016). Ces phénomènes de fusion et de fission dépendent en grande partie de la fluidité et de la rigidité de la membrane. On connaît notamment une phospholipase spécifique de la mitochondrie, la *mitochondrial phospholipase D*, qui se trouve dans la membrane externe de la mitochondrie, face cytoplasmique (Choi *et al.*, 2006). Elle transforme la cardiolipine en acide phosphatidique qui est un lipide fusogène.

Dans les muscles squelettiques des souris *Hacd1*-KO, on observe une activité oxydative plus élevée et une activité glycolytique moins élevée. Ce glissement d'un mode de production d'ATP à l'autre chez les souris *Hacd1*-KO est notamment illustré par une augmentation de l'activité de la cytochrome C oxydase et par une augmentation de l'oxydation des acides gras la nuit, où elle est normalement plus faible (figure 12) (Prola *et al.*, 2021).

Figure 12 : Augmentation de l'activité oxydative chez les souris *Hacd1-KO* par rapport aux souris WT (Prola et al., 2021).

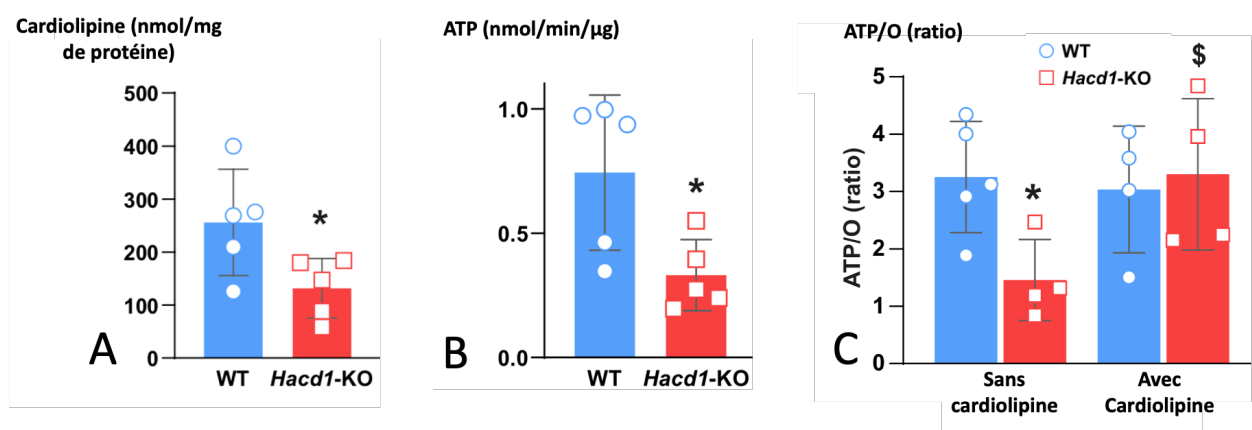
A-B. Comparaison de l'activité de la cytochrome C oxydase (COX) (A) et de l'oxydation des acides gras la nuit (B) chez les souris *Hacd1-KO* par rapport aux souris WT.



Cette consommation accrue de substrat énergétique chez les souris *Hacd1-KO* compense un manque d'efficacité des mitochondries dans la production d'ATP. On observe dans les mitochondries des souris *Hacd1-KO* une forte proportion de crêtes mitochondriales altérées et une chaîne respiratoire moins efficace, réduisant donc le flux de production d'ATP. Si on soumet les souris *Hacd1-KO* à une activité plus intense, comme la course sur tapis roulant par exemple, on observe une réduction significative de la quantité d'ATP dans les muscles et une augmentation des lactates dans le sang par rapport aux souris WT. On observe dans les mitochondries des souris *Hacd1-KO* aucune dysfonction intrinsèque de la chaîne respiratoire ou de l'ATP synthase mais une altération du transfert de protons de la chaîne respiratoire vers l'ATP synthase. Elle est due à une modification de la composition lipidique de la mitochondrie, dont la synthèse dépend d'HACD1, notamment par manque de cardiolipine, un phospholipide impliqué dans le repliement correcte des crêtes. Il a été prouvé in vitro qu'en enrichissant en cardiolipine les mitochondries des souris *Hacd1-KO* on permet l'augmentation du rapport ATP/oxygène (ATP/O), signe de l'efficacité de la chaîne respiratoire (Figure 13) (Prola et al., 2021).

Figure 13 : Composition de la membrane interne mitochondriale en cardiolipine et efficacité de la chaîne respiratoire chez les souris *Hacd1-KO* (Prola et al., 2021).

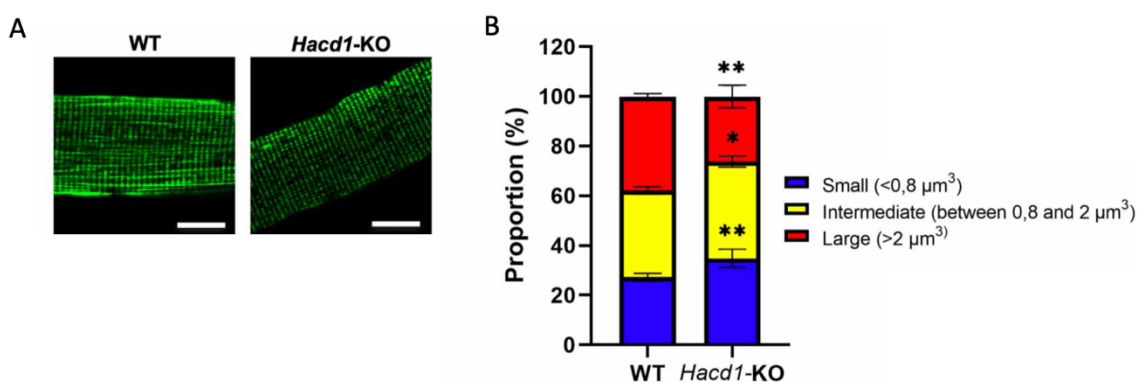
A-B. Composition en cardiolipine dans la mitochondrie (A) et production d'ATP par les muscles (B) chez les souris *Hacd1-KO* par rapport au souris WT. C. Rapport d'efficacité mitochondriales ATP/O avec ou sans complémentation en cardiolipine dans les mitochondries des muscles des souris *Hacd1-KO* par rapport au souris WT.



Enfin, on observe chez les souris *Hacd1*-KO, une augmentation de la masse mitochondriale globale dans les fibres musculaires (Prola *et al.*, 2021). En revanche une forte proportion de petites mitochondries par rapport au souris WT est retrouvée (Figure 14). La diminution de la taille des mitochondries est due à un défaut de dynamique mitochondriale, qui ne vient pas d'un déficit en protéine de fusion mais sûrement d'une différence de composition lipidique des membranes comme c'est le cas pour les myofibrilles. La membrane externe de la mitochondrie est en effet plus rigide chez les individus *Hacd1*-KO que chez les individus WT (Vandestienne-Ratnam, 2021).

Figure 14 : Morphologie du réseau mitochondrial dans les myofibrilles des souris *Hacd1*-KO (Vandestienne-Ratnam, 2021).

A. Scan d'une fibre musculaire isolée d'une souris wild type (WT) et d'une fibre d'une souris *Hacd1*-KO après incubation avec un marqueur fluorescent mitochondrial : le mitotracker vert. **B.** Répartition des mitochondries musculaires par rapport à leur taille, chez des individus WT et chez des individus *Hacd1*-KO.



En conclusion, les différentes études sur la physiopathologie de la myopathie liée à *Hacd1* convergent vers des anomalies des lipides, plus particulièrement, les acides gras à très longue chaîne et les phospholipides. Ces anomalies lipidiques joueraient un rôle clé dans la genèse de la myopathie liée au gène *HACD1*. Dans la partie suivante, nous allons nous intéresser aux acides gras et à leur élongation afin de replacer *HACD1* dans ce mécanisme complexe.

2. Les acides gras à très longue chaîne et leur élongation

A. Élongation des acides gras

a. Synthèse des acides gras à longue chaîne par le complexe *Fatty acid synthase*

Le complexe d'enzymes *Fatty acid synthase* (FAS) contient 7 activités enzymatiques en deux domaines distincts qui permettent la synthèse des acides gras à longue chaîne (LCFA). C'est un processus cyclique en 4 étapes : condensation, réduction, déshydratation et réduction à nouveau. L'allongement est initié sur une amorce acétyl-CoA ou propionyl-CoA condensée ensuite avec du malonyl-CoA comme co-substrats. Chaque cycle permet d'ajouter deux carbones à la chaîne provenant des malonyl-CoA. Ce processus peut faire jusqu'à 7 cycles successifs, donnant un acide gras saturé à 16 carbones, l'acide palmitique (C16:0) (Smith, 1994). Cette partie de l'élongation des lipides est indépendante d'*HACD1* et n'est donc pas perturbée par la mutation du gène *HACD1*.

La formule finale de la réaction est la suivante : Acétyl-CoA + 7 MalonylCoA + 14 NADPH + 14H⁺ → Acide palmitique + 7 CO₂ + 8 CoA + 14 NADP⁺ + 6 H₂O.

La lipogenèse est un mécanisme très régulé. L'insuline, la triiodothyronine et les glucocorticoïdes font partie des hormones stimulant la lipogenèse tandis que le glucagon et l'adrénaline font partie des hormones qui l'inhibent (Wang *et al.*, 2005).

b. Synthèse des acides gras à très longue chaîne à partir des acide gras à longue chaîne

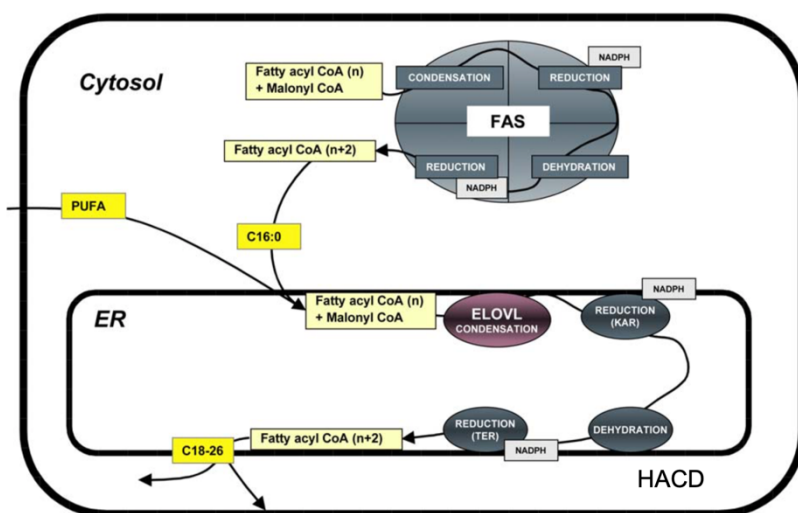
Les acides gras à longue chaîne peuvent ensuite être convertis en VLCFA par des enzymes membranaires du réticulum endoplasmique à travers un processus cyclique composé de quatre étapes: condensation, réduction, déshydratation et réduction (Ikeda *et al.*, 2008).

Ces enzymes ont d'abord été mises en évidence chez les levures : ELO2/FEN1 et ELO3/SUR4 pour la condensation aussi appelée élongation, TBR139w pour la première réduction, PHS1 pour l'étape de déshydratation et enfin la deuxième réduction est assurée par la TSC13. Ces recherches ont conduit à identifier les enzymes responsables de ces différentes étapes chez les mammifères. Les *elongases of very long chain fatty acids* 1 à 7 (ELOVL 1-7) responsables de la condensation sont les enzymes limitantes de la vitesse globale du processus d'élongation, l'enzyme KAR (de son vrai nom *hydroxysteroid 17 beta Deshydrogenase 12*, HSD17B12) est responsable de la première réduction et l'enzyme *2,3 trans-enoyl-CoA reductase* est responsable de la deuxième réduction. L'étape de déshydratation est réalisée par les HACD présentées plus haut, dont HACD1, qui est l'enzyme ne fonctionnant pas correctement dans la myopathie qui nous intéresse ici (Ikeda *et al.*, 2008).

Ces étapes ont lieu dans le réticulum endoplasmique et les enzymes sont insérées dans la membrane (Figure 15). A chaque cycle l'acide gras à n carbones devient un acide gras à n+2 carbones (Jakobsson *et al.*, 2006).

Figure 15 : Élongation des acides gras à très longue chaîne chez les mammifères (Jakobsson *et al.*, 2006)

Les acides gras synthétisés par la synthase des acides gras dans le cytosol ou provenant de l'alimentation sont ensuite allongés dans le réticulum endoplasmique, par quatre enzymes individuelles.



Les 7 ELOVL possèdent des affinités différentes pour les acides gras en fonction de la longueur de la chaîne et du niveau d'insaturation (Mida *et al.*, 2012). Au contraire, les enzymes de réduction KAR et TER ne sont pas spécifiques d'un type de chaîne d'acide gras (Kihara, 2012).

ELOVL1 est impliquée dans l'élongation des SFA de C18 à C26 avec une préférence pour les substrats à plus de 22 carbones. ELOVL 4 et 6 réalisent aussi l'élongation de SFA uniquement, pour ELOVL 6 entre C14 et C16 et pour ELOVL 4 au-dessus de C24. Les ELOVL 3 et 7 réalisent l'élongation de SFA et de MUFA entre C16 et C22, avec une préférence pour les acides gras à 18

carbones. ELOVL 2 et 5 réalisent l'élongation des acides gras polyinsaturés (PUFA), de C18 à C20 pour ELOVL2 et de C20 à C24 pour ELOVL 5 (Ohno *et al.*, 2010)(Kihara, 2012).

Chaque *Elovl* a sa propre aire d'expression dans l'organisme. ELOVL1 se retrouve surtout dans la partie myélinisée du SNC, mais est présente dans tout l'organisme. ELOVL2 est présente notamment dans le foie, le cerveau, le placenta, l'utérus, les testicules, la glande mammaire et les poumons (Pauter *et al.*, 2014). ELOVL3 est présente dans le tissu adipeux brun et s'y exprime beaucoup au moment de la formation de ce tissu lors des périodes de grands froids. Son expression est maximale au cours du développement périnatal lors du recrutement de la graisse brune. L'activité d'ELOVL3 est cependant diminuée chez des souris soumises à une exposition prolongée au froid, tout en restant au-dessus du niveau de contrôle laissant suspecter un phénomène d'habituation au froid (Jakobsson *et al.*, 2006). ELOVL3 a aussi été retrouvée dans le tissu adipeux blanc, les follicules pileux et les testicules. ELOVL4 est présente dans la rétine où sa mutation est responsable de dystrophie maculaire et est aussi exprimée dans le testicule, le cerveau, le thymus les ovaires et l'intestin grêle. ELOVL5 est détecté dans la majorité des tissus, mais en grande quantité dans le foie, les testicules et la glande surrénale, ce qui concorde avec des niveaux élevés d'acide docosapentaénoïque (C22:5). ELOVL6 et 7 sont présentes dans tous les tissus (Jakobsson *et al.*, 2006) (Ohno *et al.*, 2010).

c. Insaturation des acides gras.

La synthèse des acides gras insaturés à partir d'acides gras saturés est assurée par la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) tandis que la désaturation des PUFA et des MUFA (des acides gras déjà désaturés au moins une fois par SCD1) est réalisée par les *fatty acid desaturases* (FADS). Ces désaturases sont codées par les gènes du groupe FADS comportant les gènes *FADS1*, *FADS2* et *FADS3*. La seule exception à cette règle est l'acide gras saturé C16:0 qui est un substrat pour SCD1 mais aussi pour *FADS2* (Zhang *et al.*, 2016).

Les désaturases effectuent une déshydrogénation et introduisent une double liaison entre deux carbones de la chaîne des acides gras. Chaque enzyme permet de créer différentes doubles liaisons. SCD1 pose une première double liaison en position d9 (forme un AG CX:1, n-9). Cependant, les organismes animaux comme l'humain ou la souris ne possèdent pas de Désaturase d12 (forme un AG CX:1, n-6) et d15 (forme un acide gras CX:1, n-3) et ne peuvent donc pas produire d'acide linoléique C18:2, n-6 ou d'acide alpha-linolénique C18:3, n-3 qui sont des précurseurs de la synthèse des PUFA n-3 et n-6 par les FADS. Un apport alimentaire est donc essentiel, d'où le nom d'acides gras essentiels pour désigner l'acide linoléique et l'acide linolénique. Ensuite, *FADS1* permet de créer une liaison double en position d5. Le gène *FADS2* donne un transcrite qui peut être épissé en deux isoformes *at1* et *at2* et donne deux protéines *FADS2-AT1* et *FADS2-AT2* qui sont des protéines de la membrane plasmique. Elles permettent de créer des doubles liaisons à trois endroits différents en position d4, d6 et d8. Quant au gène *FADS3*, il est largement épissé, en 8 transcrits différents, dont les rôles sont encore mal connus (Zhang *et al.*, 2016)(Kihara, 2012).

d. Les acides gras à nombre impair de carbones

Il existe aussi des acides gras avec un nombre impair de carbone (OCSFA), par exemple, l'acide tridécanoïque (C13:0), l'acide pentadécanoïque (C15:0) et l'acide heptadécanoïque (C17:0). Ce sont des composants des produits laitiers des ruminants et des fruits de mer. Ils sont essentiellement d'origine bactérienne. Chez l'humain, ce sont des biomarqueurs de l'apport de matières grasses laitières, car leur concentration dans le tissu adipeux est corrélée à l'apport en produits laitiers. On les retrouve aussi dans le plasma, les érythrocytes et le foie. C15 et C17 sont aussi positivement liés à la sensibilité des tissus à l'insuline et donc inversement associés au diabète de type 2 (c'est l'inverse pour l'acide stéarique à 18 carbones). La proportion dans les acides gras totaux des produits laitiers aux États Unis de C13, C15 et C17 est respectivement de 0,1%, 1,2% et 0,6% (Wang *et al.*, 2019).

Leur synthèse dépend des acides gras à chaîne paire (ECSFA) par alpha-oxydation des ECSFA et par élimination d'un carbone à l'extrémité carboxylique. Des études ont montré que

l'ELOVL6 est l'élongase qui rentre principalement en jeu dans la synthèse des OCSFA, en catalysant l'élongation de C13 à C17. Aucune ELOVL ne semble capable de catalyser la réaction C17 à C19, sont apport est donc d'origine animale (Wang *et al.*, 2019).

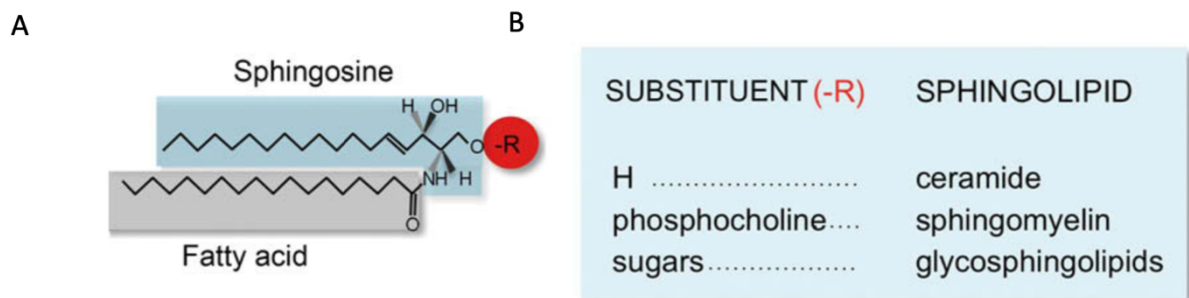
Nous avons vu dans cette partie qu'HACD1 fait partie d'un grand mécanisme complexe permettant de produire des VLCFA à partir d'Acyl-CoA. Toutefois, les VLCFA sont présents dans l'organisme sous formes saturées et insaturées ainsi que sous des formes combinées avec d'autres lipides. Les paragraphes suivants décrivent les mécanismes de formation de ces lipides.

e. Synthèse des sphingolipides à partir des acides gras à très longue chaîne

Le système de synthèse des VLCFA est présent dans tous les organes et dans tous les types de cellules de l'organisme. Les VLCFA ainsi synthétisés sont rarement présents libres non estérifiés, la plupart du temps, ils sont reliés par une liaison ester ou amide à une autre famille de lipides. On les retrouve ainsi dans les sphingolipides, les plus importants des sphingolipides simples étant les céramides et la sphingomyéline. Un sphingolipide est un lipide formé d'une base sphingoïde (la sphingosine le plus souvent), d'un acide gras et d'un radical R, liés par une liaison ester (Posse de Chaves et Sipione, 2010) (Figure 16).

Figure 16 : Exemple de la structure d'un sphingolipide (Posse de Chaves et Sipione, 2010)

A. Structure de base d'un sphingolipide avec une sphingosine, un acide gras et un radical R B.
Tableau présentant le nom de différents sphingolipides en fonction de la nature du radical R.



Les sphingolipides sont présents dans les membranes, en raison de leur nature amphiphile, où ils s'organisent en îlots membranaires. Il joue un rôle important dans l'organisation des membranes (Posse de Chaves et Sipione, 2010). On retrouve aussi les VLCFA dans les glycérophospholipides, les triacylglycérols et les esters de stérol (Ikeda *et al.*, 2008).

B. Fonction des acides gras à très longue chaîne et des lipides dérivés

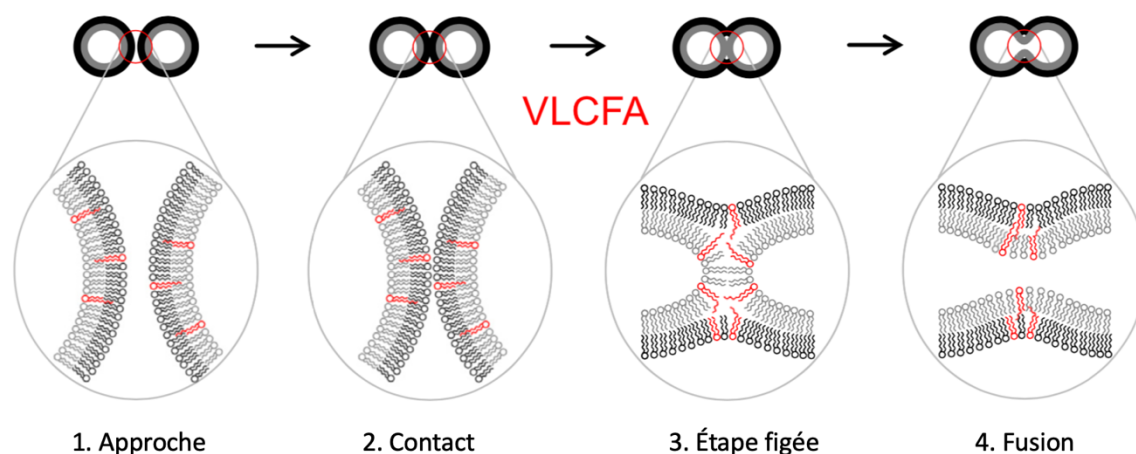
Dans les cellules, les acides gras sont stockés sous forme de triacylglycérols (les triglycérides), c'est-à-dire trois acides gras et un glycérol, stockés sous forme de gouttelettes lipidiques, en particulier dans le tissu adipeux. Ils sont ensuite hydrolysés pour être utilisés comme substrat énergétique par les mitochondries (Mukund et Subramaniam, 2020). Cependant, les VLCFA, très peu abondants, ne sont que faiblement représentés dans ces triglycérides.

Les VLCFA sont présents sous forme libre d'acide gras mais aussi essentiellement comme constituant des sphingolipides et des glycérophospholipides. Les VLCFA ont des fonctions dans les processus cellulaires, comme le maintien de l'enveloppe nucléaire, le transport des protéines et sont des précurseurs pour la production de molécules complexes bioactives lipidiques (Ikeda *et al.*, 2008).

Les lipides membranaires de type phospholipides ou sphingolipides contenant des VLCFA jouent un rôle dans la formation de la courbure membranaire et dans le trafic des vésicules. La présence de VLCFA stabilise les courbures négatives des bicouches lipidiques nécessaires à la fusion des vésicules (Molino *et al.*, 2014) (Figure 17). Et comme mentionné plus haut, les modifications de la composition de la membrane lipidique altérant la fluidité jouent un rôle dans la fusion des myoblastes (Blondelle *et al.*, 2015).

Figure 17 : Fusion de vésicules et rôle des acide gras à très longue chaîne-Sphingolipides (Molino *et al.*, 2014).

Les sphingolipides-VLCFA sont essentiel à l'étape 3, qui est une étape figée appelée stalk en anglais (« étape tige ») où la présence des VLCFA permet un comblement des espaces hydrophobes et un maintien des courbures dites négatives des bicouches lipidiques.



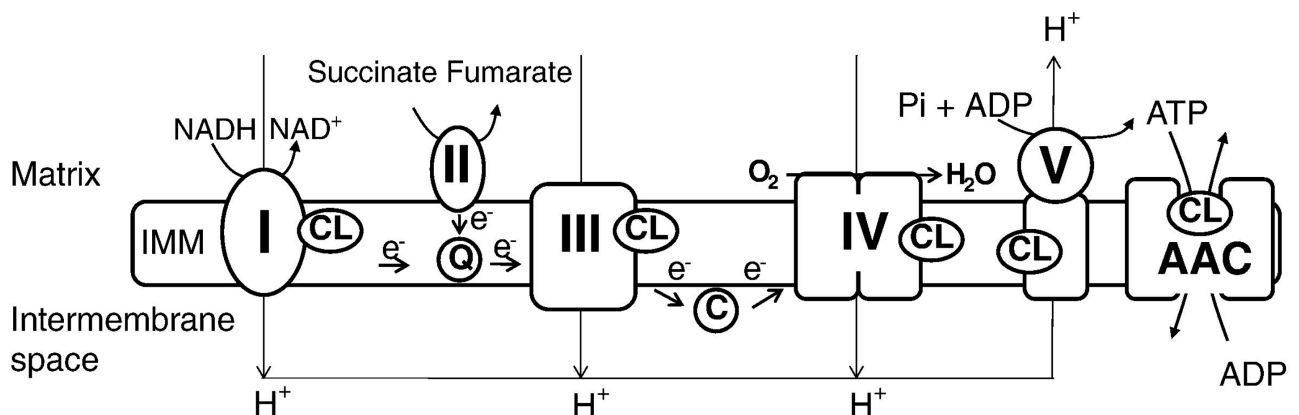
Les sphingolipides sont des lipides hautement dynamiques, capable de nombreuses interactions lipides-lipides et lipides-protéines. Ils modulent la composition en lipide des membranes et leurs propriétés biophysiques. Ils entraînent notamment des changements de courbures des membranes, par formation de domaines riches en céramides. Les changements de composition en lipide influencent les propriétés de certains récepteurs comme les canaux ioniques, ou le récepteur à l'insuline (Posse de Chaves et Sipione, 2010).

Parmi les sphingolipides, les céramides, qui contiennent une base sphingosine et un VLCFA, sont des métabolites au rôle central. Ils interviennent dans la régulation de la croissance, le maintien de la viabilité, la différenciation et la sénescence cellulaire et jouent un rôle important dans de nombreux mécanismes de réponses cellulaires. Les particularités des céramides en font un carrefour métabolique (Figure 18) car ils peuvent être transformés en de nombreuses autres molécules lipidiques.

Parmi les autres lipides complexes jouant un rôle essentiel dans le métabolisme, on peut citer la cardiolipine, un glycérophospholipide spécifique de la membrane interne de la mitochondrie. Elle contient quatre VLCFA ce qui lui confère sa forme de cône inversé et lui permet de réaliser de nombreuses interactions avec des protéines, comme les complexes I, III et IV ainsi que le cytochrome P-450 de la chaîne respiratoire (Schlame *et al.*, 1990) (figure 18).

Figure 18 : Interaction entre la cardiolipine et les complexes de la chaînes respiratoire mitochondriale (Paradies *et al.*, 2014).

La cardiolipine (CL) se lie au complexe I, III et IV ainsi qu'à l'ATPase et au cytochrome C, dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie.



Les lipides jouent un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique, ainsi que dans le développement embryonnaire, et sont une composante importante du lait. Dans la prochaine partie, nous verrons les mécanismes principaux de l'accouplement, la gestation et la lactation de la souris, qui nous seront utiles pour la partie expérimentale.

3. Accouplement, gestation et lactation chez la souris

A. Fécondation et gestation chez la souris

La souris est un mammifère polyovulant, avec environ 8 follicules ovulés par cycle. La maturité sexuelle est à environ 8 semaines, et une ovulation est possible tous les 5 jours en moyenne. La gestation dure en moyenne 19 jours (Baker et Sum O, 1976) (Monniaux *et al.*, 2009).

Comme chez beaucoup de mammifères, l'ovulation chez la souris est un processus coordonné par les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et ovariennes. Des follicules primaires sont formés quotidiennement à partir des follicules primordiaux, puis se développent grâce à l'action des gonadotrophines, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH) qui a une action uniquement sur les follicules tertiaires. Certains de ces follicules primordiaux deviendront ainsi des follicules ovariens préovulatoires. Comme chez l'humain, c'est un pic de LH qui initie le processus ovulatoire et permet la libération d'ovocytes fécondables. Seules les cellules folliculaires matures possèdent des récepteurs à la LH permettant la réponse au pic de LH. La progestérone joue aussi un rôle essentiel dans l'ovulation de la souris, notamment via le récepteur à la progestérone (PGR). Un facteur de transcription est synthétisé juste après le pic de LH et déclenche la synthèse de ce récepteur. Le PGR est à l'origine des cascades de réaction permettant notamment la dégradation de la paroi folliculaire et donc la libération de l'ovocytes (Kim *et al.*, 2009).

Chez la souris, l'accouplement avec le mâle se déroule en plusieurs étapes. D'abord, le mâle monte la femelle pendant de courts moments puis, quand celle-ci est en oestrus, on observe un nombre d'intromission du pénis dans la femelle variable, pouvant aller d'une intromission unique à plus de cent. Au moment de l'éjaculation, le mâle mord parfois la femelle puis bascule sur le côté en entraînant la femelle, et reste immobile environ 25 secondes avant la séparation (deCatanzaro, 1991) (Estep *et al.*, 1975). De plus, il y a souvent plusieurs copulations de suite chez la souris, cette deuxième série d'intromissions a lieu environ 30 minutes après la première, elle est souvent plus courte, avec moins d'intromissions. Lorsque le mâle a le choix, souvent il s'accouple avec une deuxième femelle (Mosig et Dewsbury, 1976). La durée de copulation est variable, allant de quelques minutes à 3 heures. La valeur adaptative de cette grande variabilité n'a pas clairement été établie, toutefois, l'hypothèse la plus probable est que cela joue sur la variation de fécondité de la

femelle. Il a été montré, dans une étude observationnelle, qu'il y a plus d'échec de gestation chez les femelles quand l'accouplement dure moins de 5 min. De plus il y a significativement plus de petits dans les portées résultant d'une durée d'accouplement supérieure à 30 minutes (deCatanzaro, 1991).

Chez les souris, l'accouplement est polyandrique et des portées multi-géniteurs sont possibles, même dans la nature. L'accouplement avec plusieurs mâles lors d'un cycle de reproduction provoque une compétition entre les spermatozoïdes, ce qui est une force évolutive puissante sélectionnant la descendance des mâles avec le sperme de meilleure qualité, notamment une forte concentration en spermatozoïdes dans l'éjaculat, des spermatozoïdes plus fertiles et avec un flagelle plus long par exemple (Firman et Simmons, 2008) (Parker et Pizzari, 2010).

Malgré l'importance évolutive de la compétition spermatique, on observe l'apparition d'un plug, aussi appelé bouchon copulatoire chez de nombreuses espèces : les araignées, les reptiles et certains mammifères comme la souris (Sutter *et al.*, 2016). Chez la souris, comme chez la plupart des espèces, les bouchons copulatoires sont formés par les mâles uniquement, suggérant une compétition inter-sexe entre les stratégies reproductives, illustrée par le fait que chez certaines espèces de mammifères, les femelles retirent souvent le plug après l'accouplement, comportement qui n'est toutefois pas observé chez les souris (Koprowski, 1992). Le bouchon copulatoire chez la souris est composé de protéines coagulantes produites par les vésicules séminales, les glandes coagulantes et des glandes accessoires très développées chez les rongeurs. Ce plug est très dur, adhérant étroitement à l'épithélium du vagin et difficile à retirer. Il reste en place généralement plus longtemps que la période de fécondation (Voss, 1979). La taille du bouchon diminue progressivement au cours des copulations successives (de 50% si le même jour à 19% si à 2 jour d'intervalle), d'autant plus si le temps de repos sexuel entre deux éjaculations est court. Cela montre une difficulté à produire une grande quantité de fluides séminaux. De plus, le poids du bouchon copulatoire est associé au poids corporel du mâle producteur mais pas à sa taille (Sutter *et al.*, 2016).

Le bouchon pourrait aussi être important pour le déclenchement de la gestation car il empêcherait le reflux de sperme après l'éjaculation et stimulerait le vagin pour provoquer l'ovulation. Toutefois, un petit bouchon semble suffire pour ces fonctions. Par conséquent, les avantages de la production d'un gros bouchon est encore incompris (Dean, 2013). Certains articles avancent que le plug n'empêche pas les copulations suivantes mais semble retarder l'éjaculation du mâle suivant et ainsi son sperme arriverait trop tard au site de fécondation (Ramm *et al.*, 2005). Enfin, des études montrent que le premier mâle à s'accoupler bénéficie de la part principale de la paternité dans les portées multi-géniteurs, qu'il y ait un plug ou non (Coria-Avila *et al.*, 2004) (Sutter *et al.*, 2016). Malgré son rôle encore mal compris, le plug peut être utilisé en recherche comme un bon marqueur d'éjaculation et d'une fécondation possible de la femelle (Sutter *et al.*, 2016).

Les souris sont des animaux nidicoles, pendant la gestation, les femelles construisent un nid pour y mettre bas et abriter les petits pendant les premiers jours de la lactation. Ce nid permet la thermorégulation, la protection contre les éléments et les prédateurs. C'est un comportement qui persiste chez les souris domestique ou de laboratoire. Ce comportement naturel peut être perturbé par la douleur, les infections ou le stress et a été proposé plusieurs fois comme test de bien-être chez la souris de laboratoire (Jirkof, 2014).

La souris est plus sujette que la plupart des mammifères à faire du cannibalisme sur ses propres petits. Si certains facteurs génétiques ont été avancés, ce sont surtout des effets environnementaux qui sont à l'origine de ce phénomène : le bruit, le manque d'humidité de l'air, la malnutrition, le changement d'animalier ou des cages trop souvent manipulées. Ce sont des données importantes à prendre en compte pour le bon déroulé des expériences (Lane-Petter, 1968).

B. La lactation chez la souris

Au moment de la gestation, la différenciation des cellules de la glande mammaire est induite par les hormones lactogènes comme la prolactine, l'insuline et le cortisol (Wang *et al.*, 2009). Cela entraîne

des changements métaboliques, parmi lesquels une augmentation de la synthèse des graisses, des protéines et des glucides du lait. Les acides gras de la glande mammaire ont deux origines : les acides gras à chaîne courte et moyenne sont synthétisés directement dans la glande mammaire tandis que les VLCFA (C18 et plus) sont préformés ailleurs dans l'organisme et transportés via la circulation sanguine (Mida *et al.*, 2012).

Des études ont montré que le principal facteur de modification de la composition en acides gras dans les cellules épithéliales de la mamelle n'est pas le stade de différenciation des cellules mais l'imprégnation insulinique de celles-ci. En effet, l'insuline augmente la synthèse de MUFA et diminue celle des PUFA et des SFA. Cependant, la modification de l'expression des gènes des ELOVL mais aussi des désaturases d5 et d6 présentes dans la mamelle est nécessaire à la synthèse des acides gras du lait et est liée au stade de différenciation des cellules. Cette synthèse nécessite la présence d'insuline mais aussi de prolactine et du cortisol, des hormones présentes dans les cellules uniquement différenciées. Toutefois, la composition en acides gras des cellules épithéliales mammaires diffère entre les espèces, donc l'application de ces résultats est à moduler en fonction des espèces étudiées. Par exemple, la composition en acides gras à chaîne courte chez les souris est très faible contrairement aux bovins ou aux ovins (Mida *et al.*, 2012).

Nous venons de voir les principales étapes de l'accouplement à la lactation chez la souris ainsi que les spécificités de l'espèce. Maintenant, dans une dernière partie, nous allons nous intéresser à la composition du lait, plus particulièrement à sa composition lipidique, qui est susceptible d'être modifiée par la mutation du gène *Hacd1*.

4. Composition du lait

Le lait maternel est un liquide biologique complexe, spécifique d'une espèce car adapté aux besoins du nouveau-né. Il contient des macronutriments : protéines, lipides et glucides et des micronutriments de type minéraux et vitamines. Le lait assure la nutrition du nouveau-né et confère aussi des éléments anti-infectieux, anti-inflammatoires, antioxydants et de protection de la muqueuse intestinale (Tackoen, 2012).

Le lait est composé de différentes phases : Une phase aqueuse appelée le lactosérum, qui contient l'eau, le lactose et des protéines solubles, des micelles de caséines contenant des protéines insolubles, des émulsions de globules gras contenant des lipides, composés de phospholipides et de cholestérol, empêchant l'agglutination des globules gras avec les vitamines et enfin des cellules vivantes (globules blancs) (Jensen, 1999).

A. Composition du lait humain

a. Composition générale

La composition du liquide nourricier produit par la glande mammaire change au cours de la lactation, d'abord le colostrum durant les 3-5 premiers jours, moins riche en lipides et en lactose mais qui contient plus d'immunoglobulines A et des facteurs de croissance ainsi que des cellules immunitaires. Puis ensuite un lait de transition pendant 2 semaines environ conduisant au lait mature (Tackoen, 2012). Le lait maternel humain est composé à 88% d'eau, sa capacité énergétique représente 67 kcal/100 ml pour le lait mature et sa teneur en protéines ne dépasse pas 1,2g/dl. On distingue deux catégories de protéines : les protéines solubles du lactosérum qui représentent chez l'humain 70% et les protéines insolubles qui représentent 30%. Le rapport protéines solubles sur protéines insolubles est spécifique à chaque espèce : par exemple, chez la vache, la quantité de protéine est bien plus élevée et le rapport est inversé par rapport à l'humain. La principale protéine nutritionnelle chez l'humain est la lactalbumine, et la lactoglobuline chez la vache (Tackoen, 2012) (Tableau 1).

Tableau 1 : Teneurs indicatives en énergie, en protéines, lipides, glucides et minéraux du lait de vache, du lait artificiel pour nourrisson et de femme (Tackoen, 2012).

Pour 100 ml	Lait de vache	Lait pour nourrissons		Lait maternel mature
Calories (Kcal)	65	66 à 73		67
Protéines (g)	3,7	1,24 à 1,9		1
- Caséine (%)	70 %	30 à 60 %	0 si lait HA	30 %
- α -lactalbumine (g)	0,2			0,32
- β -lactoglobuline (g)	0,35			0
- Immunoglobulines (g)	0,05			0,15
Lipides (g)	3,5	2,6 à 3,8		3,5
- Triglycérides (%)	98			98
- Cholestérol (%)	(13 mg/dl)			0,5 (20 mg/dl)
- Phospholipides (%)				0,7
- Ac. linoléique (mg)	90 (2-3 %)	460 à 600		350 (10 %)
- Ac. linoléique (mg)	Traces (< 1 %)	40 à 65		37 (1 %)
- DHA (%)	0	(6,4 à 7,9 mg/dl)		0,2 à 1,2
- AA (%)	0,3	(7,3 à 11 mg/dl)		0,5
Carbohydrates (g)	4,5	6,7 à 9,5		7,5
- Lactose (%)	100 (4,5 g/dl)	47 à 100		85 (5,7 g/dl)
- Dextrine-maltose (g)	0	1,1 à 2,6		0
- Autres sucres	Traces d'oligosaccharides	Amidon, glucose, fructose, saccharose		Oligosaccharides (1,3 g/dl)
Sels minéraux (mg)	900	250 à 500		210
- Sodium (mg)	48	16 à 28		16
- Calcium (mg)	125	43 à 93		25
- Phosphore (mg)	95	39 à 58		13
- Fer (mg)	0,03	0,7 à 1		0,05

Le lait est riche en lipides. Ils sont la première source énergétique du lait et fournissent 50% des calories (Jensen, 1999). L'apport est d'environ 25g par jour de la naissance jusqu'à 6 mois. La teneur en lipides du lait maternel augmente dès le début de la lactation et selon l'état nutritionnel de la mère. Le lait est aussi plus riche en lipides le jour que la nuit.

Le lactose est la deuxième source d'énergie du lait, il fournit 40% des calories du lait. Le lait contient des traces d'autres oligosaccharides mais le lactose reste le glucide principal du lait. Enfin, le lait contient des minéraux et des vitamines (Tackoen, 2012) (Tableau 2).

Tableau 2 : vitamines et minéraux du lait maternel humain (Tackoen, 2012).

Vitamines et minéraux du lait maternel			
Vitamine		Minéraux	
A	670 mg/l	Calcium	280 mg/l
B1	210 mg/l	Phosphore	140 mg/l
B2	350 mg/l	Magnésium	35 mg/l
PP	1.500 mg/l	Chlore	420 mg/l
B5	1.800 mg/l	Potassium	525 mg/l
B6	93.000 mg/l	Sodium	161 mg/l
B8	4 mg/l	Cuivre	250 µg/l
B9	85 mg/l	Fer	300 µg/l
B12	0,97 mg/l	Iode	110 µg/l
C	40.000 mg/l	Zinc	1.200 µg/l
D	0,55 mg/l	Manganèse	6 µg/l
E	2.300 mg/l	Sélénium	20 µg/l
K	2,1 mg/l		

Il y a une relation inverse entre la durée de la grossesse et la quantité de protéines, de minéraux et d'acides gras dans le colostrum. Les mères avec les enfants les plus immatures ont donc un colostrum plus protecteur. La nutrition de la mère influence peu la composition du lait, à l'exception de celle en acides gras et en certains microéléments comme les vitamines, l'iode et le sélénium notamment (Tackoen, 2012).

b. Composition lipidique

La composition lipidique du lait maternel est la suivante : 98% de triglycérides, 0,8% de phospholipides et 0,5% de cholestérol. La quantité de lipide dans le lait augmente au cours de la lactation (Tableau 3). Le lait contient aussi en plus petite quantité des lipides complexes comme la sphingomyéline, des glycosylcéramides, d'autres stérol comme le lanostérol ou le diméthylstérol, ou encore des gangliosides (Jensen, 1999).

Tableau 3 : Composition du lait humain en lipides au cours du temps (D'après Jensen, 1999)

Lipid class	Percentage of total lipids at lactation day				
	3	7	21	42	84
Total lipid % in milk	2.04 ± 1.32 ^b	2.89 ± 0.31	3.45 ± 0.37	3.19 ± 0.43	4.87 ± 0.62
Phospholipid	1.1	0.8	0.8	0.6	0.6
Monoacylglycerol					
Free fatty acids					
Cholesterol (%)	1.3	0.7	0.5	0.5	0.4
(mg/d) ^c	34.5	20.2	17.3	17.3	19.5
1,2-Diacylglycerol					
1,3-Diacylglycerol					
Triacylglycerol	97.6	98.5	98.7	98.9	99.0
Cholesteryl esters ^d (mg/dL)	5	1	1	1	1
<i>n</i>	39	41	25	18	8

La composition en acide gras des lipides du lait varie en fonction de l'alimentation et en fonction du jour de l'accouchement. En effet, des différences significatives dans la composition du lait sont observées si le nouveau-né est né avant ou après le terme de la grossesse. Enfin, le dernier facteur est le jour de lactation, car le lait est plus riche en lipides à mesure que la lactation avance. Le tableau suivant (Tableau 4) présente la quantité moyenne de chaque acide gras en pourcentage sur le poids total de l'échantillon de lait. Ce tableau est issu d'une revue qui analyse les différentes compositions du lait humain par pays et en fonction du régime alimentaire. Ce tableau est la synthèse moyenne de toutes les données disponibles dans les différents pays (Jensen, 1999).

Tableau 4 : Composition en acide gras du lait humain en pourcentage de poids total de l'échantillon au cours du temps et en fonction de la naissance à terme ou non du nouveau-né (Jensen, 1999).

	Day 5		Day 10		Day 20		Day 30	
	Term = 32	Preterm = 19	Term = 38	Preterm = 19	Term = 38	Preterm = 17	Term = 38	Preterm = 17
10:0	0.50 (0.10)	0.46 (0.09)	0.95 ^a (0.22)	1.06 ^a (0.13)	1.05 (0.26)	1.15 (0.22)	1.01 (0.30)	1.08 (9.24)
12:0	3.42 (0.91)	4.17 (0.81)	5.18 ^a (1.31)	6.19 ^{a,e} (1.88)	5.39 (1.19)	7.17 ^d (1.17)	5.21 (1.50)	6.07 (1.64)
14:0	5.86 (1.25)	7.65 (1.50)	6.49 (1.47)	9.00 ^e (1.67)	8.93 (1.21)	8.97 ^c (1.70)	6.90 (2.05)	7.93 (2.02)
16:0	24.97 (2.36)	24.79 (1.24)	22.56 ^b (2.00)	22.62 (2.11)	23.18 (2.09)	22.58 (1.90)	22.47 (2.31)	22.84 (1.26)
18:0	7.07 (0.73)	6.34 (1.59)	7.42 (0.90)	7.54 ^e (0.94)	7.74 (0.75)	7.85 (0.90)	7.40 (0.82)	7.65 (0.72)
Total Sat	43.65 (3.55)	44.16 (3.20)	43.05 (3.67)	47.41 ^{c,e} (3.60)	46.28 (3.83)	48.09 ^e (3.50)	44.30 (5.00)	46.78 (2.46)
18:1n-9	32.10 (1.87)	33.83 (2.30)	32.10 (2.61)	30.81 ^c (2.36)	31.97 (1.73)	29.81 (2.98)	31.50 (2.49)	31.38 (3.95)
Total trans	0.96 (0.35)	1.01 (0.40)	1.097 (0.41)	1.07 (0.43)	1.49 (0.56)	1.13 (0.31)	1.13 (0.46)	1.26 (0.27)
18:2n-6	8.86 (1.30)	9.88 (1.86)	10.30 ^c (2.15)	9.56 (1.60)	10.47 (2.10)	10.17 (1.57)	11.33 (2.17)	10.49 (1.95)
18:3n-6	0.14 (0.31)	0.11 (0.09)	0.15 (0.08)	0.11 (0.09)	0.18 (0.09)	0.16 (0.07)	0.18 (0.10)	0.17 (0.03)
20:2n-6	0.57 (0.12)	0.54 (0.08)	0.42 ^a (0.06)	0.39 ^b (0.06)	0.31 ^a (0.06)	0.32 ^c (0.06)	0.30 (0.07)	0.32 (0.06)
20:3n-6	0.53 (0.13)	0.50 (0.15)	0.43 ^b (0.11)	0.45 (0.05)	0.38 (0.06)	0.941 (0.04)	0.38 (0.08)	0.41 (0.08)
20:4n-6	0.72 (0.07)	0.74 (0.12)	0.59 ^a (0.09)	0.64 ^b (0.08)	0.50 ^a (0.06)	0.51 ^a (0.04)	0.45 (0.07)	0.48 (0.03)
22:4n-6	0.23 (6.00)	0.24 (0.08)	0.15 ^a (0.03)	0.14 ^a (0.03)	0.10 ^a (0.02)	0.11 ^a (0.02)	0.08 (0.02)	0.11 (0.02)
Total n-6 LCPUFA	2.15 (0.34)	2.13 (0.32)	1.59 ^b (0.20)	1.69 ^b (0.19)	1.35 ^a (0.17)	1.35 ^a (0.13)	1.28 (0.19)	1.31 (0.19)
Total n-6	11.57 (1.94)	12.20 (2.34)	12.25 (2.17)	11.11 (1.75)	12.09 (2.32)	11.64 (1.70)	13.06 (2.50)	12.02 (1.50)
18:3n-3	0.65 (0.07)	0.67 (0.12)	0.81 ^b (0.17)	0.67 (0.09)	0.78 (0.11)	0.78 (0.15)	0.90 (0.20)	0.73 (0.14)
20:3n-3	0.09 (0.03)	0.09 (0.05)	0.05 ^b (0.03)	0.00 (0.04)	0.05 (0.04)	0.05 (0.04)	0.05 (0.04)	0.00 (0.00)
20:5n-3	0.04 (0.08)	0.00 (0.04)	0.00 ^c (0.03)	0.00 (0.05)	0.04 (0.05)	0.05 (0.05)	0.05 (0.07)	0.00 (0.04)
22:5n-3	0.22 (0.05)	0.22 (0.05)	0.18 ^a (0.04)	0.15 ^a (0.04)	0.15 (0.04)	0.15 (0.01)	0.15 (0.03)	0.15 (0.01)
22:6n-3	0.46 (0.08)	0.43 (0.08)	0.39 ^c (0.06)	0.35 ^c (0.06)	0.27 ^a (0.07)	0.24 ^c (0.05)	0.23 (0.06)	0.24 (0.05)
Total n-3 LCPUFA	0.80 (0.21)	0.73 (0.17)	0.66 ^a (0.11)	0.60 ^a (0.13)	0.53 (0.15)	0.42 (0.07)	0.48 (0.16)	0.42 (0.07)
Total n-3	1.51 (0.32)	1.38 (0.20)	1.51 (0.26)	1.30 (0.16)	1.43 (0.32)	1.13 (0.07)	1.52 (0.45)	1.13 (0.07)
Total LCPUFA	3.08 (0.46)	2.85 (0.55)	2.34 ^a (0.28)	2.30 ^b (0.30)	1.90 ^a (0.33)	1.66 ^b (0.16)	1.80 (0.30)	1.66 (0.16)
n6/n3 LCPUFA	2.60 (0.55)	2.71 (0.42)	2.69 (0.63)	2.71 (0.68)	2.56 (0.63)	2.88 (0.72)	2.58 (0.61)	2.88 (0.72)

La grande majorité des acides gras se trouve dans le lait sous forme de triglycérides. Ils sont formés dans le réticulum endoplasmique des cellules de la glande mammaire. Les AG sont absorbés à partir de la circulation ou synthétisés de novo à partir de glucose. La glande mammaire ne synthétise que les acides gras jusqu'à 14 carbones. Les VLCFA sont importés depuis la circulation. Les PUFA présents dans le lait sont principalement d'origine alimentaire ou hépatique. L'alimentation permet notamment l'apport en acides gras essentiels, l'acide linoléique (C18:2 n-6) et l'acide alpha-linolénique (C18:3 n-3) (Demmelmair et Koletzko, 2018).

La digestion des lipides du lait n'est pas assurée par la lipase pancréatique, qui est immature chez le nouveau-né. Elle est assurée par les lipases linguales et gastriques, et par une lipase spécifique déjà présente dans le lait qui est activée dans le tube digestif en présence des sels biliaires. Le lait humain est riche en acides gras polyinsaturés, on trouve notamment de l'acide arachidonique (AA) (C20:4 n-6) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA) (C22:6 n-3), dérivés des acides gras essentiels linoléique (C18:2, n-6) et alpha-linolénique (C18:3 n-3). Ces VLCFA sont

essentiels pour le développement des nouveau-nés. L'AA et le DHA sont des constituants des membranes des cellules neuronales et de la rétine, leur incorporation dans le tissu nerveux dépend de la quantité de VLCFA et de leurs précurseurs disponibles dans le lait maternel qui elle-même dépend de la quantité présente dans l'alimentation maternelle au cours de la grossesse et de l'allaitement. En effet, les nouveau-nés peuvent difficilement synthétiser le DHA à partir de l'acide alpha-linolénique contrairement à l'adulte (tackoen, 2012).

Le lait est spécifique d'espèce, la quantité de nutriments est différentes en fonction du régime alimentaire de la mère et des besoins spécifiques des nouveau-nés de chaque espèce. Ainsi, même si notre étude porte sur une maladie touchant les humains et les chiens, notre modèle d'étude expérimentale étant la souris, la partie suivante traitera de la composition du lait de souris, particulièrement celle en acides gras pour pouvoir correctement interpréter les résultats de notre étude.

B. Composition du lait de souris

a. Composition générale

Le lait de la souris est comme le lait humain composé de matières grasses, de protéines solubles et insolubles et de lactose. La proportion de ses différents composants est reportée dans le Tableau 5 (Görs *et al.*, 2009).

Tableau 5 : Composition du lait de souris (Görs *et al.*, 2009).

Composition du lait de souris, prélevé par traite sous anesthésie, en pourcentage (+/- écart type), en fonction du jour de lactation et de la méthode de conservation du lait (lait frais ou lait congelé).

	Jour 14		Jour 19	
	Frais	Congelé	Frais	Congelé
Matière sèche (%)	37.8 ± 0.24	34.9 ± 3.93	36.3 ± 0.36	36.0 ± 0.39
Matière grasse brut (%)	12.7 ± 0.29	13.5 ± 0.66	10.1 ± 0.57	10.3 ± 0.69
Protéine brut (%)	20.1 ± 0.63	19.3 ± 0.16	20.8 ± 0.75	20.8 ± 1.19
Lactose (%)	2.43 ± 0.28	2.49 ± 0.11	2.84 ± 0.10	2.84 ± 0.25

Aucune différence n'était observée entre le lait frais et le lait congelé (Görs *et al.*, 2009).

b. Composition lipidique

Les lipides du lait sont majoritairement des triglycérides comme chez l'humain. Il existe plusieurs études sur la composition du lait en acides gras, en fonction du régime alimentaire des mères. Le Tableau 6 présente la composition en acides gras du lait de souris nourries avec des aliments riches en acides gras saturés ou insaturés. Le lait a été obtenu par une méthode de traite des femelles, sous anesthésie générale (DePeters *et al.*, 2001).

Tableau 6 : Composition en acides gras du lait de souris nourries avec une alimentation riche en acides gras insaturés ou une alimentation riche en acides gras saturés (d'après de Peters et al., 2001).

Fatty acid	Unsaturated diet	Saturated diet
C4–C10	3.74	3.33
C12:0	4.95	5.14
C14:0	6.67	8.15
C16:0	21.73	28.18
C18:0	5.10	6.81
C18:1 <i>cis</i> 9	20.63	23.16
C18:2	26.67	12.32
C18:3	1.66	1.76
C20:4	0.66	0.46
C22:5	0.13	0.12
C22:6	0.53	0.36
C18:1 <i>trans</i>	0.18	0.59

Les données en gras sont celles qui semblaient pour les auteurs différentes visuellement, mais aucun test statistique ne confirme la différence significative entre le régime riche en SFA par rapport au régime riche en PUFA.

Le Tableau 7 présente la composition en acides gras du lait chez de souris nourries avec un régime pauvre en graisse (5% de l'énergie apportés par les lipides) (*Low fat diet*) et un régime riche en graisse (20% de l'énergie apportés par les lipides) (*High fat diet*). Le lait a été obtenu par une technique de traite manuelle des souris, sans anesthésie générale. Aucune différence significative n'a été mise en évidence par l'étude (Silverman *et al.*, 1992).

Tableau 7 : Acides gras totaux (mg/g de lait) et proportion (en pourcentage) des différents acides gras présents dans le lait de souris nourries avec un régime riche en graisse face à un régime pauvre en graisse (Silverman *et al.*, 1992)

Mouse	Days post-partum	Number of pups	Total fatty acids	Proportion								
				10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2 18:3	
High fat diet												
A	3	10	66	2.3	4.2	2.7	24.4	4.8	2.6	43.8	9.9	1.4
A	8	10	125	4.1	6.9	9.3	25.6	3.3	3.8	36.1	8.5	1.3
A	12	10	42	5.5	8.0	8.9	22.6	4.4	5.9	35.9	9.0 ^a	
A	18	8	113	6.5	8.7	9.5	22.5	4.7	5.7	37.0	10.9 ^a	
B	6	5	62	2.6	4.8	4.9	20.5	4.0	2.4	45.6	11.1	1.2
B	11	4	267	3.7	5.3	6.1	21.8	3.9	3.3	44.9	11.0 ^a	
B	16	4	136	4.5	6.3	7.3	22.0	3.1	4.2	41.2	10.1	1.2
C	2	9	65	3.4	3.6	6.3	26.0	2.6	2.6	44.3	11.1 ^a	
C	5	9	62	3.3	4.9	7.1	24.5	4.6	3.8	41.1	13.6 ^a	
C	10	4	179	3.2	4.9	6.0	22.0	4.0	3.4	44.9	11.3 ^a	
D	1	12	91	1.9	2.4	4.6	23.4	6.0	2.5	43.2	12.6	1.8
D	6	12	153	3.6	6.0	7.5	23.3	4.0	3.2	39.9	9.2	1.1
D	9	8	163	3.5	5.7	6.8	22.3	4.5	3.4	43.5	10.4 ^a	
D	15	3	146	3.2	5.4	7.0	22.8	4.6	3.2	43.4	10.3 ^a	
E	2	10	45	3.0	5.0	8.0	25.4	5.4	2.3	38.0	10.7	1.8
E	6	10	137	4.5	7.2	7.8	23.8	3.1	3.2	37.6	9.4	1.1
E	10	8	153	5.7	8.4	9.5	22.9	3.1	3.8	36.0	8.9	1.2
E	17	4	51	3.5	5.5	7.0	21.8	4.2	3.7	41.3	10.2 ^a	
F	3	10	102	2.2	4.3	7.2	25.6	4.8	3.1	40.3	10.5 ^a	
F	6	5	179	2.4	4.7	6.9	24.2	3.6	3.6	41.3	10.4 ^a	
G	2	16	60	2.4	5.0	7.8	21.9	3.6	4.9	40.8	10.1	1.0
G	8	9	30	2.8	4.1	8.6	22.3	3.6	4.2	34.0	10.2	1.2
Low fat diet												
H	2	14	99	4.0	6.3	8.2	22.6	3.4	3.6	39.0	9.6	1.4
H	5	12	132	3.8	7.2	11.0	30.4	7.4	2.2	30.8	5.2	1.1
I	4	11	111	3.8	6.7	11.2	28.1	5.6	3.0	33.8	7.4 ^a	
J	3	13	134	2.8	5.6	8.9	27.7	7.6	2.0	30.2	7.4	1.0
J	6	11	160	4.2	8.4	12.8	29.8	7.3	3.5	28.3	4.9	1.0
K	4	10	88	2.5	5.0	8.8	30.0	6.5	3.8	36.5	6.7 ^a	
L	3	10	54	2.9	5.0	8.1	27.3	5.9	2.9	40.4	6.5	1.0
L	6	6	125	2.8	5.0	8.1	27.9	5.9	2.4	39.7	4.7	1.2
M	2	14	119	3.1	5.9	11.1	30.1	5.3	2.5	32.9	5.3	1.2
M	7	8	119	4.2	8.0	11.2	26.0	5.4	2.6	34.5	4.8	0.8
M	12	3	48	4.2	7.4	9.7	27.3	5.6	3.8	30.8	6.3	1.2
N	2	7	61	2.8	7.5	9.6	25.5	3.3	3.4	39.0	9.3	1.1
N	7	6	186	3.5	5.3	8.4	23.6	5.1	2.2	34.2	4.4	0.7

Les données de la littérature sont assez pauvres en valeurs de référence pour la composition en acides gras dans le lait de la souris, notamment pour les VLCFA de plus de 20 carbones, mais les données présentées dans les tableaux ci-dessus pourront nous servir de référence pour l'analyse des données attendues lors de notre étude.

C. Implication des lipides dans la gestation et le développement post-natal

Le développement du cerveau chez l'enfant dépend de facteurs génétiques et environnementaux, pour la plupart mal connus. Le cerveau est composé de lipides, dont 35% de VLC-PUFA, essentiels pour la myélinisation, la croissance des neurones et l'arborisation dendritique ainsi que fonctionnellement pour la neurotransmission synaptique. Pendant la gestation, les VLC-PUFA maternels passent par transfert placentaire. Chez l'humain, l'allaitement est important pour le développement cognitif du nouveau-né, ces effets de l'allaitement seraient attribués au VLC-PUFA présents dans le lait (Morales *et al.*, 2011).

Le lait doit notamment fournir les acides eicosapentaénoïque (EPA C20:5 n-3), l'AA (C20:4 n-6) et le DHA (C22:6 n-3). (Morales *et al.*, 2011). Des études tenant compte de la variation génétique de la mère et des enfants sur les gènes des désaturases et des élongases ont notamment prouvé que la présence d'une activité FADS1 plus faible et une activité FADS2 plus élevée augmente les ratios EPA/AA et DHA/AA et diminuent la quantité totale d'AA dans le colostrum et confèrent un avantage cognitif et cela, indépendamment du régime alimentaire de la mère (Morales *et al.*, 2011). Quant à l'effet de l'allaitement sur la cognition, il dépend de la variation génétique chez l'enfant touchant les gènes des désaturases et des élongases. En effet, chez les enfants possédant une faible capacité de synthèse de VLC-PUFA, les scores de cognition sont plus élevés chez les enfants allaités par rapport à ceux non allaités alors que pour les enfants avec une capacité accrue de synthèse de VLC-PUFA, le score de cognition était élevé quelle que soit la méthode d'allaitement. Toutefois, il est très difficile de vraiment exclure de ces études les variantes sociales ou comportementales pouvant représenter des biais, notamment sur le choix d'un allaitement ou non par la mère (Morales *et al.*, 2011).

Les PUFA oméga 3 (n-3) et oméga-6 (n-6) d'origine alimentaire sont essentiels pour de nombreuses fonctions biologiques, comme la croissance, la mise en place du système immunitaire et le métabolisme, notamment le DHA qui joue un rôle dans le métabolisme hépatique (Pauter *et al.*, 2014). Au cours de la gestation, SREBP est présent dans les cellules hépatiques du fœtus puis diminue à un niveau très bas lors de la naissance, puis réaugmente lors du sevrage, à environ 21 jours chez les souris. Au niveau des *Elovl* dans le foie, *Elovl1* est beaucoup plus exprimé dans le foie du fœtus, puis s'effondre lors de la naissance, *Elovl2* reste dans des quantités inchangées, *Elovl5* augmente continuellement de la naissance au sevrage. ELOVL5 étant la seule élongase qui augmente à la suite du sevrage, en parallèle de l'augmentation de la quantité de PUFA et de MUFA dans le foie, cela tend à prouver que c'est l'élongase responsable de la majorité des élongations dans le foie (Wang *et al.*, 2005).

Ces informations montrent l'importance des VLCFA dans le développement néonatal. Le lait maternel permet un apport naturel de ces différents nutriments. Or on se souvient que la mutation du gène *Hacd1* perturbe la synthèse des VLCFA au moins dans les muscles, ainsi, notre étude de la composition lipidique du lait chez les femelles mutées pour *Hacd1* est intéressante et pourrait permettre de mettre en évidence des différences de composition susceptibles de perturber le développement des petits.

D. Autres mutations connues du cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne influençant la gestation et la composition du lait

Chez les souris, l'absence d'expression d'*Elovl2* provoque des niveaux plus bas de PUFA C22 dans le sérum et une hépato-insuffisance. ELOVL2 est le facteur dominant de la synthèse des PUFA C22 notamment le DHA dans le foie. La carence en DHA endogène dans le foie provoque l'activation de la SREBP-1C qui stimule la transcription des autres gènes lipogéniques comme le FAS et le SCD1. A l'inverse la supplémentation en DHA réprime la transcription hépatique et dégrade le SREBP-1C. On observe chez les souris déficientes en ELOVL2 une oxydation plus élevée des lipides, ce qui permet une moindre accumulation de graisse. Les souris ayant une mutation du gène *Elovl2* sont donc réfractaire à la prise de poids, à prise de nourriture identique. Comme chez les souris mutantes pour *hacd1*. L'expression d'*Elovl2* est aussi essentielle pour la fertilité mâle, en effet un déficit en ELOVL2 bloque le développement de la tête des spermatozoïdes, au moment de l'emballage de la tête notamment (Zadravec *et al.*, 2011).

ELOVL5 est très présente dans le foie, et est souvent associée avec les désaturases d5, d6 et d9. Ces trois enzymes sont régulées par l'alimentation, surtout au cours du développement postnatal (Wang *et al.*, 2005). Toutefois, les souris déficientes en *Elovl5* présentent aussi une activation de la lipogenèse dépendante de SREBP-1C. En revanche, ces souris ne présentent pas un phénotype maigre mais plutôt une prédisposition à la stéatose hépatique (Pauter *et al.*, 2014).

5. Étude de l'impact de la perte de fonction du gène *Hacd1* sur la gestation et la lactation de la souris

Il a été mis en évidence que les souris *Hacd1*-KO présentaient un défaut métabolique dans les muscles, conduisant à un rendement en ATP plus faible au repos et à l'effort ainsi qu'une résistance à la prise de poids même sous régime riche en graisse (Prola *et al.*, 2021). Ce déficit métabolique pourrait compromettre le bon déroulement d'évènements très demandeurs en énergie comme la gestation et surtout la lactation. De plus, HACD1 intervenant dans l'élongation des VLCFA et les VLCFA entrent dans la composition du lait (DePeters *et al.*, 2001), la mutation du gène *Hacd1* pourrait modifier la composition du lait des souris *Hacd1*-KO.

Nous avons donc décidé d'étudier la gestation et la lactation des souris femelle *Hacd1*-KO en suivant la prise de poids des mères et des souriceaux. Nous avons aussi décidé d'étudier la composition en acide gras de leur lait pour voir l'effet de la mutation d'*Hacd1* sur la composition du lait

Deuxième partie : étude expérimentale

1. Introduction

Le but de ce travail était de décrire les effets de la myopathie liée au gène *Hacd1* dans le cadre de la gestation et de la lactation. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de souris mutantes *Hacd1*-KO afin d'explorer les effets de la perte de fonction du gène *Hacd1* sur la croissance des souriceaux au cours de la lactation et sur la composition du lait produit par les femelles mutante pour *Hacd1*. Nous avons composé trois groupes d'études, un groupe de souriceaux issus de mère *Hacd1*-KO et de pères WT qui étaient donc hétérozygotes pour le gène *Hacd1* (groupe 1), un groupe de souriceaux issus de mère WT et de pères *Hacd1*-KO qui étaient donc aussi hétérozygotes pour le gène *Hacd1* (groupe 2) et un dernier groupe de souriceaux issus de parents WT donc aussi WT (groupe 3).

Notre première hypothèse était que la mutation du gène *Hacd1* pourrait avoir un impact sur la fertilité des individus et donc produire des portées plus petites. Nos hypothèses suivantes étaient que les souris femelles *Hacd1*-KO pourraient rencontrer des difficultés à mener une gestation et une lactation à terme à cause de la forte demande énergétique que cela représente. Nous avons aussi pour hypothèse que la mutation du gène *Hacd1* pourrait perturber la composition du lait des souris, mais de manière minime car les lipides du lait sont surtout d'origine alimentaire ou produits dans des tissus comme le foie où *Hacd1* s'exprime peu et l'expression d'*Hacd1-fl* est pour le moment inconnu dans la glande mammaire. Notre dernière hypothèse était que les souriceaux pourraient avoir des problèmes de croissance quand ils sont issus de mères *Hacd1*-KO mais que les souriceaux hétérozygotes pour le gène *Hacd1* issus de mères WT, n'auraient pas de différence de croissance avec les petits WT issus de mères WT car la myopathie ne s'exprime que chez les individus homozygotes.

Le modèle avec trois groupes nous permettait d'avoir une comparaison de l'effet de la mutation sur la fertilité chez les femelles (groupe 1) et chez les mâles uniquement (groupe 2), puis l'effet de la mutation sur la gestation et la lactation chez les mères *Hacd1*-KO (groupe 1) par rapport aux mères WT (groupe 2 et 3) et aussi de l'effet de la mutation à l'état hétérozygote chez les souriceaux (groupes 1 et 2) face aux souriceaux sauvage (groupe 3).

Pour répondre à nos hypothèses, nous avons suivi la prise de poids des femelles de l'accouplement à la naissance puis au cours de la lactation ainsi que le poids des souriceaux jusqu'au sevrage. Nous avons aussi prélevé du lait pour l'analyse lipidomique et pesé des organes clés (foie, rein, cœur, muscle...) ainsi que mesuré la glycémie sur certains individus mis à mort.

Le projet a été accepté par le comité d'éthique et agréé par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (référence du dossier : 2022112310212734, projet : caractérisation métabolique de souris modèles d'une myopathie mitochondriale).

2. Matériels et méthodes

A. Modèle animal utilisé

La souris est un animal facile à élever, qui prend peu de place et dont le génome est complètement séquencé. La souris représente un modèle idéal pour l'étude de l'effet des mutations sur l'organisme. Les souris mutantes nécessaires à cette étude ont été obtenues à partir d'un fond génétique de souris de laboratoire noires appelées C57 black 6N.

Les animaux inclus dans cette étude étaient des souris mâles et femelles homozygotes pour l'allèle sauvage d'*Hacd1* (+/+) appelées dans la suite de ce document souris WT (+/+) et des souris mâles et femelles homozygotes avec double allèle muté *Hacd1* (-/-) appelées dans la suite de ce

document souris-KO (-/-). Au total dans cette étude, ont été utilisées 18 femelles primipares dont 16 étaient nées entre février et mars 2023 et 2 au mois de juin 2023. Parmi les 18 femelles, on compte 5 femelles *Hacd1*-KO et 13 femelles WT. De plus, 9 mâles, nés entre février et mars 2023, 6 de génotype WT et 3 de génotypes *Hacd1*-KO ont été inclus dans cette étude (Tableau 8).

Tableau 8 : Liste des souris adultes utilisées au cours de l'étude

Sexe	nom	date de naissance	génotype <i>Hacd1</i>
Femelle	F6-643-670	27/02/2023	-/-
	F6-643-673	27/02/2023	-/-
	F5-615-680	03/06/2023	-/-
	F5-195-227	27/02/2023	-/-
	F5-196-237	27/02/2023	-/-
	F5-201-248	03/02/2023	+/+
	F5-201-246	03/02/2023	+/+
	F5-640-683	03/12/2023	+/+
	F6-633-659	27/02/2023	+/+
	F5-195-226	27/02/2023	+/+
	142	19/03/2023	+/+
	143	19/03/2023	+/+
	144	19/03/2023	+/+
	145	19/03/2023	+/+
	F5-195-229	27/02/2023	+/+
	171	04/03/2023	+/+
	174	04/06/2023	+/+
170	04/03/2023	+/+	
Mâle	F5-202-258	10/03/2023	-/-
	F6-630-239	27/02/2023	-/-
	F6-630-653	27/02/2023	-/-
	F5-615-676	06/03/2023	+/+
	F5-615-675	06/03/2023	+/+
	F5-202-257	10/03/2023	+/+
	F6-630-649	27/02/2023	+/+
	F6-630-650	27/02/2023	+/+
	F5-202-256	25/03/2023	+/+

Toutes les **souris *Hacd1*-KO** sont nées dans l'unité de recherche. Pour la lignée *Hacd1*-KO, l'identification de chacune des souris est composée de trois éléments : la génération, le numéro de sa mère et le numéro unique de la souris, par exemple, pour la souris F5-202-258, il s'agit d'une souris faisant partie de la 5^{ème} génération née dans le laboratoire, de la femelle 202, et le 258 est son numéro personnel d'identification.

Pour les souris **wild-type**, la plupart étaient des frères et sœurs des souris des souris *Hacd1*-KO, mais certaines provenaient d'une lignée C57Bl/6 de laboratoire ; pour cette lignée, seuls les trois derniers chiffres d'identification ont été retenus.

Les souris étaient élevées dans l'animalerie du bâtiment Chauveau de l'EnvA, au numéro d'agrément 94-046-2. L'animalerie était éclairée 12 heures par jour, de 6 heures à 18 heures. Les conditions de température et d'hygrométrie ont été dans les normes pendant toute la durée de l'expérimentation. De l'eau et de l'alimentation étaient présentées ad libitum aux souris.

B. Accouplement et suivi de gestation.

À partir des souris adultes définies plus haut, des accouplements ont été réalisés selon trois groupes. Le premier groupe correspondait aux femelles *Hacd1*-KO accouplées avec des mâles sauvages afin d'obtenir des petits hétérozygotes élevés par des mères *Hacd1*-KO. Le deuxième groupe correspondait à des femelles sauvages accouplées avec des mâles *Hacd1*-KO afin d'obtenir des petits hétérozygotes élevés par des mères WT. Le dernier groupe correspondait à l'accouplement d'individus sauvages afin d'obtenir des petits WT élevés par des mères WT. Un nombre de 5 portées par groupe était nécessaire pour la réalisation de l'étude.

Pour l'accouplement, les femelles étaient placées avec les mâles, chaque cage contenait ainsi un mâle et une ou deux femelles. Les différents génotypes étaient mis en contact afin de respecter les groupes d'études décrits plus haut. Le 29 mai 2023, 15 femelles ont été mises à la reproduction avec 9 mâles, puis à la suite des cas de cannibalisme observés, de nouveaux accouplements ont été réalisés aux cours de l'étude avec de nouvelles femelles primipares et des mâles déjà utilisés précédemment pour atteindre les 5 portées nécessaires par groupe d'étude. Tous les accouplements sont présentés dans le tableau suivant (tableau 9).

Tableau 9 : Liste des accouplements réalisés au cours de l'étude.

Mâles		Femelles		Groupe d'étude	Date d'accouplement	Cannibalisme
Identification	Génotype	Identification	Génotype			
F5-615-676	+/+	F6-643-670	-/-	1	29-mai	
		F6-643-673	-/-	1	29-mai	
F5-615-675	+/+	F5-615-680	-/-	1	29-mai	
F5-202-257	+/+	F5-195-227	-/-	1	29-mai	
		F5-196-237	-/-	1	29-mai	
F5-202-258	-/-	F5-201-248	+/+	2	29-mai	
		F5-201-246	+/+	2	29-mai	
F6-680-653	-/-	F5-640-683	+/+	2	29-mai	oui
		F6-633-659	+/+	2	29-mai	
F6-630-239	-/-	F5-195-226	+/+	2	29-mai	
F6-630-649	+/+	142	+/+	3	29-mai	oui
		143	+/+	3	29-mai	
F6-630-650	+/+	144	+/+	3	29-mai	
		145	+/+	3	29-mai	
F5-202-256	+/+	F5-195-229	+/+	3	29-mai	oui
F6-630-653	-/-	B6-N-174	+/+	2	21-juin	
F6-630-650	+/+	B6-N-171	+/+	3	21-juin	
F5-202-256	+/+	B6-N-170	+/+	3	24-juin	

Les femelles étaient ensuite pesées trois fois par semaine (lundi, mercredi et le vendredi) avant 10h. Au moment de la pesée, pendant les 15 premiers jours la présence de plugs était relevée. La prise de poids et la présence d'un plug sont les deux critères utilisés pour mettre en évidence la survenue d'une fécondation. Pour la prise de poids, il a été décidé qu'une prise de poids de plus de 2g entre 2 pesées représentait une augmentation suffisante pour supposer que la femelle était gestante. Toutefois, devant la difficulté de visualisation des plugs et le peu de plugs observés en pratique lors de l'expérience, le critère de la prise de poids fut le seul retenu pour l'isolement des femelles considérées comme gestantes.

Lors de l'isolement des femelles jugées gestantes, un changement de cage était réalisé, la femelle gardait la moitié du nid construit avec le mâle et un peu de litière, ce qui évitait trop de stress chez la femelle qui arrivait dans un nouvel environnement. On réalisait aussi un passage de l'aliment classique à l'aliment d'élevage. Quatre ou cinq jours après l'isolement, une observation attentive

était réalisée pour déterminer si la femelle avait bien construit son nid (Figure 19). On regardait ensuite si la mise bas avait eu lieu, l'observation était reproduite toutes les 48h. Dès que les petits étaient observés, la date de naissance était déterminée visuellement d'après les critères de développement des petits répertoriés dans la grille suivante (Figure 20). Par la suite, nous utiliserons la notation des jours comme présentée dans la figure 20, ainsi, le jour de naissance des souriceaux est donc le J0 et ainsi de suite. La première manipulation ne se faisait qu'à J4 pour limiter le risque de cannibalisme. À J4, une nouvelle datation était réalisée à l'aide de la même grille pour confirmer la date de naissance.

Figure 19 : Photo de différents nids réalisés par les souris femelles gestantes

Photo d'un nid avec la maison en carton fourni pour la souris (A) et un autre nid une fois la maison retirée (B).

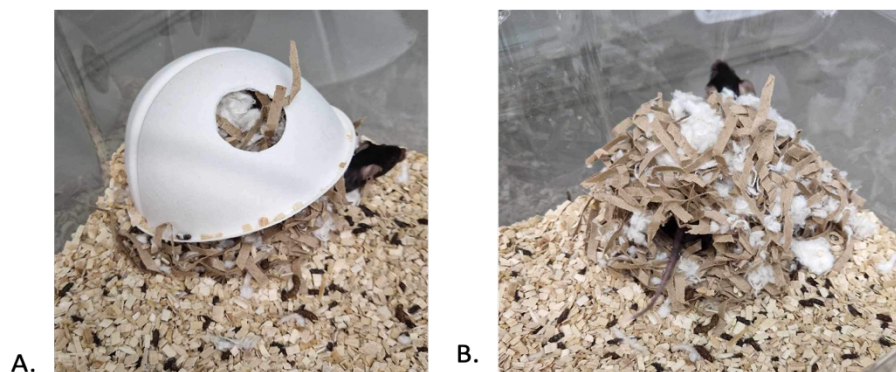
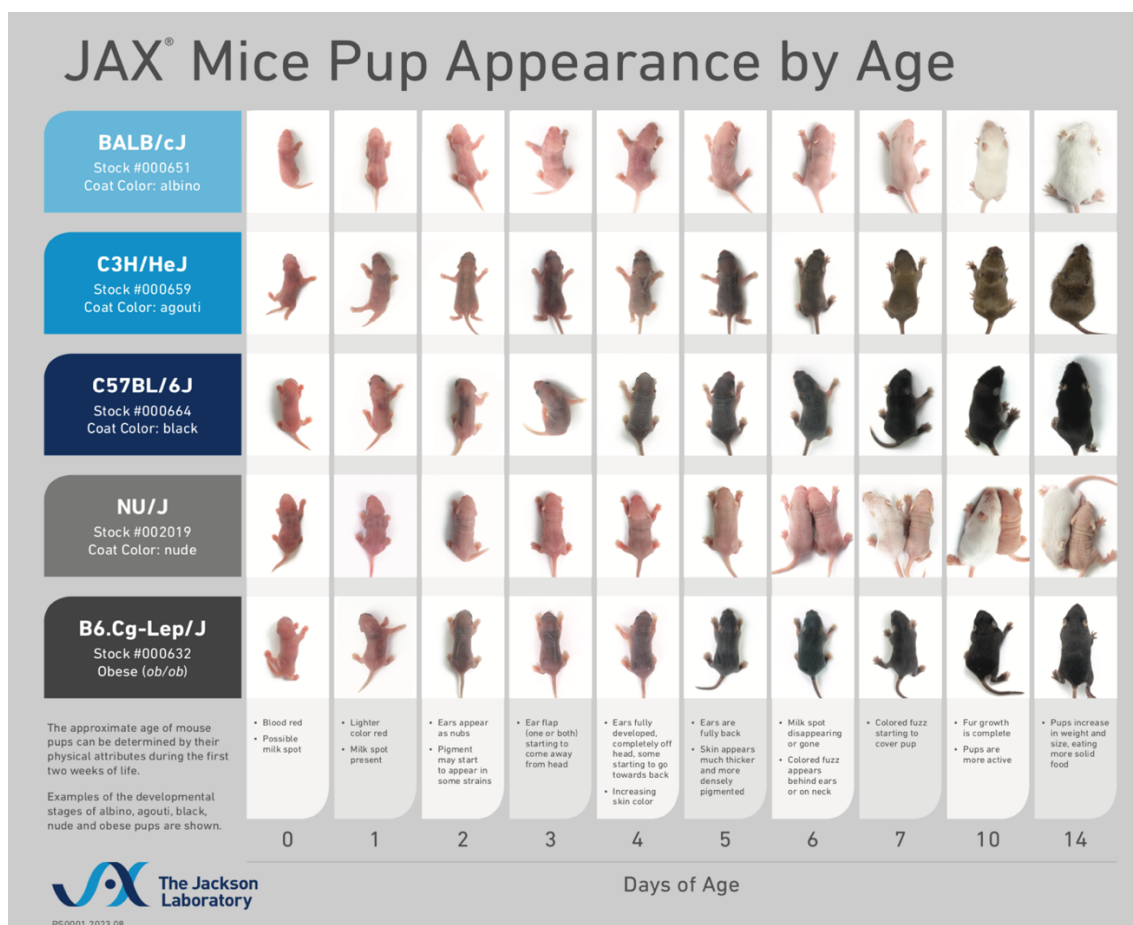


Figure 20 : Tableau de détermination de l'âge des souriceaux, fourni par le laboratoire Jackson.

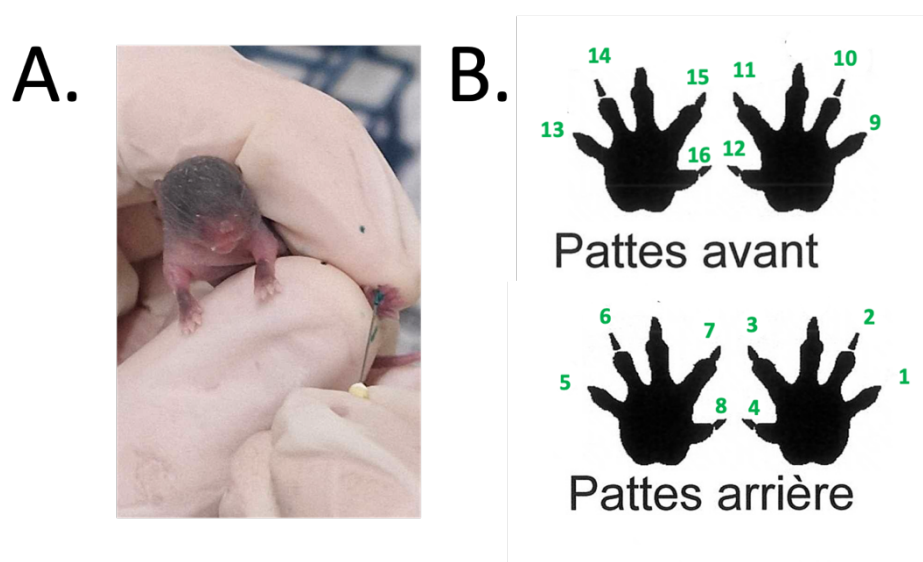


C. Suivi des femelles et des souriceaux au cours de la lactation

À partir de J4, afin de pouvoir distinguer les différents petits, un tatouage avec de l'encre verte, de marque Ketchum, vendu par Fine Science Tool (référence : 24201-01) était réalisé sur l'un des doigts du souriceau avec une aiguille de 30 gauges (Figure 21). Ces tatouages étaient réalisés selon une notation des doigts déterminée par nos soins. (Figure 21). Si au cours des pesées successives, l'un des tatouages n'était plus assez visible, un nouveau marquage était effectué au même endroit.

Figure 21 : Tatouage des jeunes souriceaux à J4

Photo d'un souriceau à 4 jours lors de la réalisation du tatouage du doigt numéro 4 (A) et légende du code de tatouage en fonction du numéro du souriceau, lorsque celui-ci se trouve sur le dos (B).



Pour réaliser les tatouages, les petits étaient isolés de la mère par demi-portée, on tatouait la première demi-portée, posée dans un caisse avec de la litière sale afin que les petits gardent l'odeur de la mère, puis on réalisait un échange de demi-portée en remettant de la sciure sale sur les petits rendus à la mère afin de réduire l'odeur apportée et diminuer le stress.

Chaque jour une pesée était réalisée, d'abord de la mère, puis des petits, par demi-portée, sur le même principe que le protocole réalisé pour le tatouage, par isolement de la demi-portée puis pesée de chaque petit un par un grâce à l'identification par tatouage, puis échange avec l'autre demi-portée. Toutefois, lorsque les petits arrivaient vers l'âge de 20 jours (à J20), ils commençaient à beaucoup bouger et pour plus de praticité une modification du protocole était réalisée. On isolait désormais la totalité de la portée et on pesait les petits un par un, puis on les remettait avec la mère immédiatement après la pesée. A chaque pesée, quelques croquettes étaient enlevées de la mangeoire pour être données directement dans la cage comme récompense. La pesée était l'occasion aussi de remplir les biberons d'eau et les mangeoires d'aliments. Ainsi, on ne déplaçait pas les cages à d'autres moments de la journée.

En ce qui concerne l'hygiène des cages, aucun changement de cage n'était fait pendant les 15 premiers jours après la naissance afin d'éviter le stress et le cannibalisme. Ensuite, les changements de cage étaient réalisés une fois par semaine, en gardant le nid et la maison ainsi qu'un peu de sciure sale. Chaque femelle recevait un nouveau coton au changement de cage afin de compléter son nid.

Il avait été établi lors du dépôt de saisine du comité éthique que du nutrigel hypercalorique et appétant de type SAFE *gel diet high fat* serait donné aux femelles et aux souriceaux en cas de perte de poids de 10% de la femelle par rapport au poids de la pesée à J4 ou si 2 petits ou plus présentaient une stagnation voire une perte de poids sur 2 jours. En cas de perte de poids de plus

de 20% de la mère pendant 2 jours de suite malgré ces mesures, la mère et la portée seraient mises à mort. Si le poids d'un petit stagnait pendant plus de trois jours, il serait individuellement euthanasié.

Afin de supprimer les biais pouvant être dus aux différences de poids de base des femelles, et de voir véritablement l'effet de la gestation et de la lactation sur le poids des femelles en fonction de leur génotype, nous avons décidé d'étudier aussi à partir de la prise de poids des femelles, l'anabolisme dû à la gestation et à la lactation. Nous avons ainsi calculé l'anabolisme absolu, c'est-à-dire le poids au pic de croissance pendant la lactation moins le poids à l'accouplement, ainsi que l'anabolisme relatif, c'est-à-dire l'anabolisme absolu divisé par le poids à l'accouplement (anabolisme absolu = poids au pic - poids accouplement ; anabolisme relatif = anabolisme absolu/poids accouplement).

Puis, nous allons calculer un deuxième anabolisme, celui-là pour voir l'effet de la lactation seulement, donc entre le premier jour de pesée des femelles après la mise bas, à J4 et le jour du pic de poids pendant la lactation, ainsi qu'un anabolisme relatif qui correspond à l'anabolisme absolu/le poids à J4 (anabolisme 2 absolu = poids au pic - poids à J4 ; anabolisme 2 relatif = anabolisme absolu/Poids accouplement).

Au jour 28 de lactation, une dernière pesée était réalisée puis on vérifiait le sexe des souriceaux et on réalisait le sevrage.

D. Mise à mort et prélèvements des souriceaux

La mise à mort d'un petit par portée était réalisée à J9, J10 ou à J11, lors du pic de lactation. Pour choisir le petit prélevé, on regardait l'ensemble des poids et on prenait le petit représentatif s'approchant le plus du poids moyen par rapport aux autres petits. Au moment du prélèvement, on prenait une glycémie à la mère à l'aide d'un glucomètre, par coupure du bout de la queue (<0,5 mm). Le souriceau était ensuite sorti de l'animalerie dans une petite boîte avec un substrat composé de coton, quelques grains sales de litière de la cage de la mère et une bouillotte faite à l'aide d'un gant rempli d'eau tiède.

L'euthanasie du petit est réalisée par décapitation conformément à la méthode recommandée par l'Union européenne cet âge. À ce moment-là, le sang était prélevé et une glycémie était réalisée. Puis, différents prélèvements étaient pratiqués. L'estomac était prélevé puis on retirait délicatement le contenu par ouverture de la paroi et décollement du bol alimentaire, cette étape s'est révélée assez facile à réaliser en pratique. Ensuite, le contenu de l'estomac qui formait un moule de la forme de celui-ci était pesé puis placé dans le tube numéro 1 qui était ensuite rempli d'azote. Le foie, le rein gauche et le cœur étaient ensuite pesés, puis le foie était placé dans le tube numéro 2 qui était ensuite rempli d'azote. Ensuite le tibia droit était mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. Enfin, un morceau de la queue était prélevé pour le génotypage a posteriori des souriceaux, et placé dans le tube n°4. Le sang prélevé au début de la dissection était ensuite centrifugé à 1000g, puis le sérum était récupéré et placé dans le tube n°3. Une fois les 4 tubes remplis ils étaient placés dans un congélateur à -80°C.

E. Mise à mort et prélèvements des mères

Une fois le sevrage des petits effectué, les mères étaient euthanasiées par dislocation cervicale puis disséquées. Le poids de différents organes était noté : le cœur, le foie, le rein gauche, le tissu adipeux entourant les cornes utérines, ainsi que la taille du tibia droit, mesurée avec un pied à coulisse.

F. Analyse lipidomique.

L'analyse des lipides a été réalisée par une plateforme extérieure, la plateforme de lipidomique Metatoul de l'Inserm de Toulouse (MetaToul-Lipidomique (I2MC, Inserm, Toulouse, France), MetaboHUB-ANR-11-INBS-0010), qui fournissait une analyse de la composition absolue et relative en acides gras à partir des échantillons de lait obtenus dans l'estomac des souriceaux. Le protocole utilisé par la plateforme était le suivant : les échantillons étaient d'abord broyés à l'aide de

l'instrument de broyage FastPrep®-24 de l'entreprise MP Biomédical dans 1 ml d'eau et d'EGTA à la concentration 5nM. Ensuite, Pour chaque échantillon, 2 mg de lait étaient prélevés puis placés dans un mélange de dichlorométhane, d'eau et de méthanol à 2 % d'acide acétique et avec 10µL d'étalons internes (TG19). Après centrifugation à 2500 tour/min pendant 6 min, l'extrait lipidique était évaporé à sec. L'extrait lipidique était ensuite hydrolysé dans du KOH à 55 °C pendant 30 min. L'échantillon subissait ensuite une transméthylation dans une solution méthanoïque de trifluorure de bore à 14 % et de l'heptane à 80 °C pendant 1 h. Après avoir ajouté de l'eau (1 ml), les esters d'acides gras ainsi obtenus étaient extraits avec de l'heptane, centrifugés pendant 1 min à 2 500 tr/min, évaporés à sec et dissous dans de l'acétate d'éthyle. 1µL de la solution ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse, utilisant une colonne capillaire de silice fondue de marque Famewax RESTEK. Les contrôles qualités précédant les tests étaient tous corrects.

G. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Graphpad Prism (Ritme scientific solution). Lors de l'étude des données en fonction du groupe d'étude, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis (KW) permettant l'analyse des groupes a été utilisé. Il était considéré comme statistiquement significatif à $p < 0,05$. En cas de test significatif, des tests non paramétriques de Mann-Whitney (MW) deux à deux ont été réalisés, considérés aussi comme statistiquement significatif pour $p < 0,05$. En cas d'étude de données en fonction du génotype des parents, un test deux à deux non paramétrique de MW était directement utilisé, considéré lui aussi comme statistiquement significatifs pour $p < 0,05$. Sur les graphiques, * représente un test significatif pour $p < 0,05$; ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$. L'absence d'astérisque représente un résultat non significatif. Enfin, nous avons utilisé Graphpad pour tracer des droites de régression linéaire. Les données sont considérées comme corrélées si l'indice de régression R au carré est supérieur à 0,8.

3. Résultats

A. Accouplement et gestation

a. Observation générale

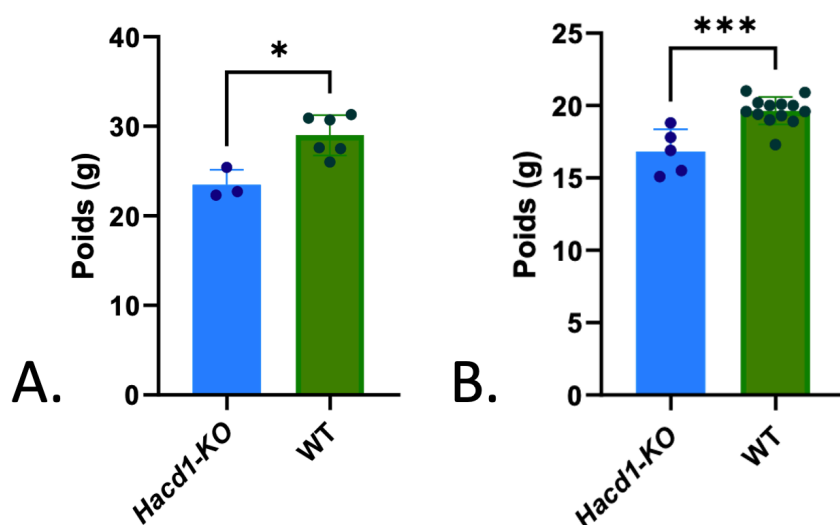
L'élevage des souris s'est globalement bien déroulé, 100% des femelles isolées étaient bien gestantes et ont eu des souriceaux. Aucune femelle n'a eu de problème de nidification, chaque femelle a bien réalisé un nid, quel que soit son génotype. Le comportement des souris était normal au vu de la littérature et des connaissances des animaliers, cependant, trois cas de cannibalisme qui seront décrits plus bas, sont à signaler chez les souris WT. Les souris *Hacd1*-KO ont fait preuve d'un comportement maternel visuellement identique à celui des souris WT, avec en particulier un comportement en lactation identique à chaque fois que celui-ci a pu être observé.

b. Comparaison des poids des parents à l'accouplement

Nous avons voulu vérifier que les individus mâles et femelles *Hacd1*-KO présentaient bien un poids plus faible que les individus WT en raison de leur plus faible masse musculaire. Il existe bien une différence significative entre le poids des individus *Hacd1*-KO et des individus WT mâles (MW, $p = 0,024$) et femelles (MW, $p = 0,0008$) (Figure 22).

Figure 22 : Poids des individus au moment de l'accouplement.

Poids des mâles (A) et des femelles (B) en fonction de leur génotype lors de l'accouplement (moyenne +/- écart type).



c. Accouplement et isolement

Dans cette partie nous nous intéresserons aux données obtenues de la période allant de la mise en contact des mâles avec les femelles jusqu'à l'isolement des femelles gestantes. Le tableau suivant (Tableau 10) présente le suivi du poids des femelles de l'accouplement à l'isolement lorsqu'elles étaient jugées gestantes.

Parmi les premières femelles isolées (Tableau 10.A), trois cas de cannibalismes ont été observés chez des femelles WT, les numéros 683, 142 et 229. Seule la 142 fut observée avec des petits encore vivants, sans que l'on sache si le cannibalisme avait déjà commencé ou non. Pour les autres, seul le nid détruit et des traces de sang, ainsi que la perte visuelle de poids ont permis de conclure au cannibalisme. D'autres accouplements ont donc été réalisés. Le suivi de poids de ces trois nouvelles femelles est présenté dans le Tableau 10.B. Nous avons remarqué rétrospectivement que sur les 15 femelles, 4 auraient dû être isolées à la pesée précédente si on appliquait strictement les critères décrits dans le matériel et méthode. Par conséquent, pour ces 4 femelles, nous utiliserons par la suite les données relevées au jour théorique d'isolement et non au jour pratique.

Avec cette méthode d'isolement, aucune femelle non gestante n'a été isolée par erreur. Les deux séries d'accouplement nous ont permis d'obtenir le nombre de portées attendu pour la suite de notre étude.

Tableau 10 : Suivi du poids des femelles du contact avec le mâle jusqu'à l'isolement.

A. Poids des femelles du premier groupe d'accouplement au cours du suivi après la mise en contact avec le mâle. **B.** poids des femelles des nouveaux accouplements à la suite des cas de cannibalisme. Le jour d'isolement est en jaune, le jour d'isolement théorique, quand il est différent, est en jaune pâle et les cases sont grisées une fois le suivi de poids terminé et l'isolement réalisé.

ID femelles	Génotype M	Groupe	29/05	31/05	02/06	05/06	07/06	09/06	12/06	14/06	16/06	19/06	21/06	23/06	26/06
F6-643-670	-/-	1	15,1	15,4	15,6	16	17,1	18,4	20,9	23,4					
F6-643-673	-/-	1	15,5	16,2	15,6	16,3	17,2	17,8	19,5	21,8	25,1				
F5-615-680	-/-	1	16,9	17,5	17,7	17,8	18,6	19,3	21	23,6					
F5-195-227	-/-	1	17,8	17,7	17,3	18,3	19,5	20,9	23,2	26,7					
F5-196-237	-/-	1	18,8	18,1	18,2	18,2	19,2	19	19,2	20,3	20,5	21,8	23,9		
F5-201-248	+/+	2	19,6	19,4	20	20,5	21,1	21,5	24,2	28					
F5-201-246	+/+	2	18,9	18,9	18,9	19,7	19,6	19,2	19,2	20,6	21,3	24,7	27,7		
F5-640-683	+/+	2	20	20,6	21	22,4	22,8	24,5	27,5	30,7					
F6-633-659	+/+	2	17,3	18,5	18,4	18,1	18,4	19,2	19,3	20,1	22,5	27			
F5-195-226	+/+	2	20,9	20,5	20,8	21,9	22	21,7	29,3	32					
142	+/+	3	19	21	20,7	21,6	21,7	23	24,6	27,3					
143	+/+	3	19,3	19,7	20,2	20,1	21,5	22,5	23,1	25,5	27,8				
144	+/+	3	20,2	20,2	20,4	20,6	20	21,3	23	25,2	27,7				
145	+/+	3	19,4	19,7	20,1	20	20,2	20,7	21,4	22	22,5	23,1	23,6	24,5	28,5
F5-195-229	+/+	3	19,6	19,8	19,9	20,9	21,7	22,5	25	28,2					

A.

ID femelles	Génotype M	Groupe	21/06	23/06	26/06	28/06	30/06	03/07	05/07	07/07	10/07	12/07	14/07	17/07	19/07	21/07
171	+/+	3	21	21,7	22	22,7	23,1	27								
174	+/+	2	20	20,3	20,5	21,3	23,95	23,2	23,7	25,4	27,3					
170	+/+	3	20,1	20,6	19,9	20,9	20,7	20,7	21,2	21,7	21,8	21,09	21,8	23,21	24,2	26,12

B.

d. Évolution des poids des femelles au cours de la gestation en fonction du génotype

À partir des poids mesurés pendant le suivi des femelles avant l'isolement (Tableau 10), nous avons pu construire rétrospectivement un suivi de poids des femelles par jour au cours de la gestation (Tableau 11 et Figure 23). Nous avons inclut uniquement une femelle sur les trois ayant cannibalisé leurs petits, la 142, car c'est la seule dont nous soyons sûrs de la date de mise-bas. Nous avons tracé le graphique de comparaison du jour moyen d'isolement en fonction du génotype des mères. Aucune différence significative du jour moyen d'isolement n'a été mise en évidence (KW, $p = 0,573$) (Figure 26). La courbe de poids des femelles est similaire pour les trois groupes, et la croissance est linéaire tout le long de la gestation. Les pics parfois présents, notamment sur la courbe du groupe 2 (courbe verte) sont sûrement dûs au faible nombre d'individus (Figure 23).

Une comparaison du poids des femelles a été réalisée au jour de l'isolement en fonction du génotype des femelles (Figure 24). Il existe une différence significative entre le poids à l'isolement des femelles du groupe 1 et du groupe 2 (MW, $p = 0,037$) et entre les femelles du groupe 1 et du groupe 3 (MW, $p = 0,0087$). En groupant les femelles par génotype on obtient aussi une différence significative entre le poids à l'isolement des femelles *Hacd1*-KO du groupe 1 et des femelles WT des groupes 2 et 3 (MW, $p = 0,0025$) (Figure 24).

Tableau 11 : Suivi du poids des femelles au cours de la gestation.

Poids des femelles en fonction du jour de gestation, déduit à partir de la date de la mise bas. Le jour d'isolement est coloré en jaune, le jour d'isolement théorique, quand il est différent, est en jaune pâle.

ID femelles	Génotype	Groupe	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14
F6-643-670	-/-	1		15,6			16		17,1		18,4			20,9		23,4
F6-643-673	-/-	1			16,3		17,2		17,8			19,5		21,8		25,1
F5-615-680	-/-	1		18,6		19,3			21		23,6					
F5-195-227	-/-	1		17,3			18,3		19,5		20,9			23,2		26,7
F5-196-237	-/-	1	19,2		20,3		20,5			21,8		23,9				
F5-201-248	+/+	2	20			20,5		21,1		21,5				24,2		28
F5-201-246	+/+	2			19,2		20,6		21,3			24,7		27,7		
F6-633-659	+/+	2	18,4		19,2			19,3		20,1		22,5			27	
F5-195-226	+/+	2		21,9		22		21,7			29,3		32			
174	+/+	2			23,95			23,2		23,7		25,4			27,3	
143	+/+	3	22,5			23,1		25,5		27,8						
144	+/+	3	21,3			23		25,2		27,7						
145	+/+	3		22		22,5			23,1		23,6		24,5			28,5
171	+/+	3	21,7			22		22,7		23,1			27			
170	+/+	3		21,09		21,8			23,21		24,2		26,12			

Figure 23 : Courbe de suivi de poids des femelles au cours de la gestation

Poids moyen des femelles par génotype.

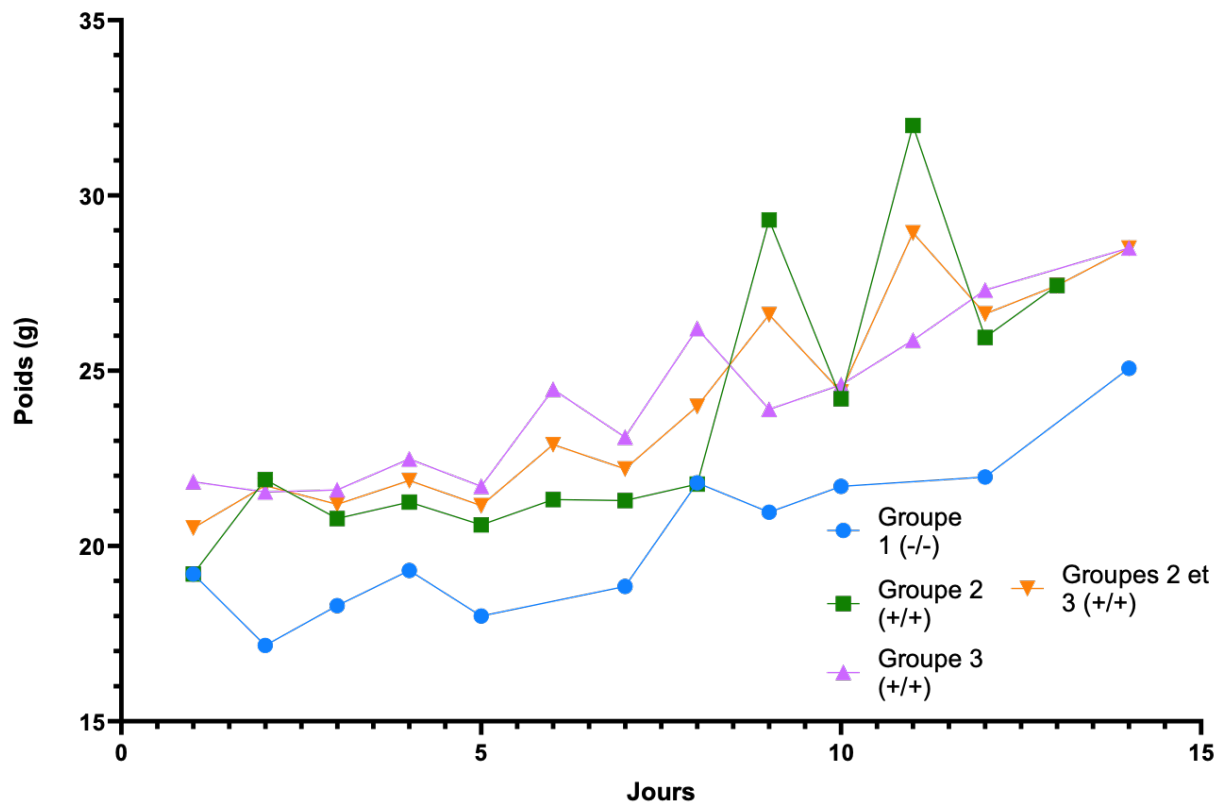
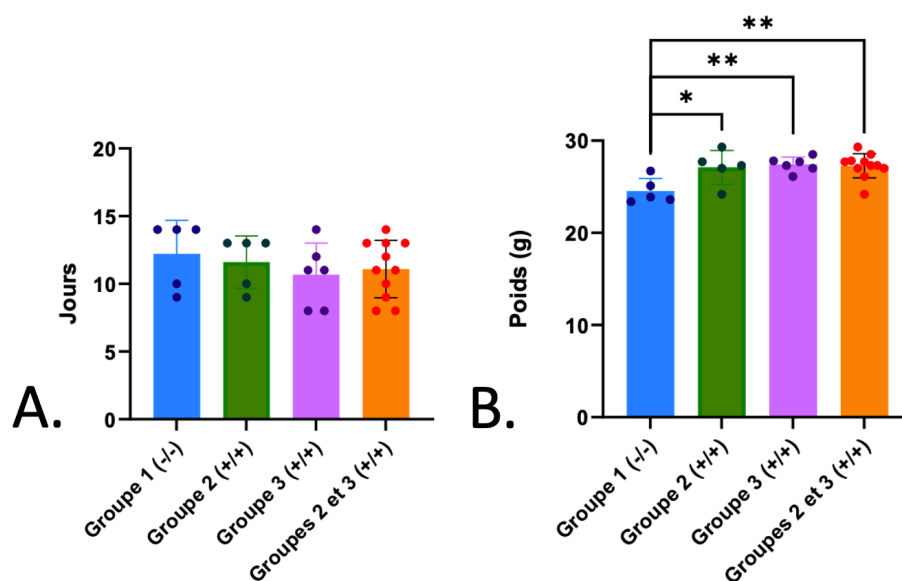


Figure 24 : Jour moyen d'isolement des femelles.

Jour d'isolement des femelles en fonction du groupe (A) et poids des femelles au jour d'isolement (B) (moyenne +/- écart type).



B. Croissance des souriceaux pendant la lactation

Dans cette partie, nous présenterons les données de suivi du poids des souriceaux de la lactation jusqu'au sevrage. A partir de cette partie, aucune femelle cannibale n'a été prise en compte, ce qui diminue à 15 le nombre de femelles.

a. Comparaison du nombre de souriceaux en fonction du génotype des parents.

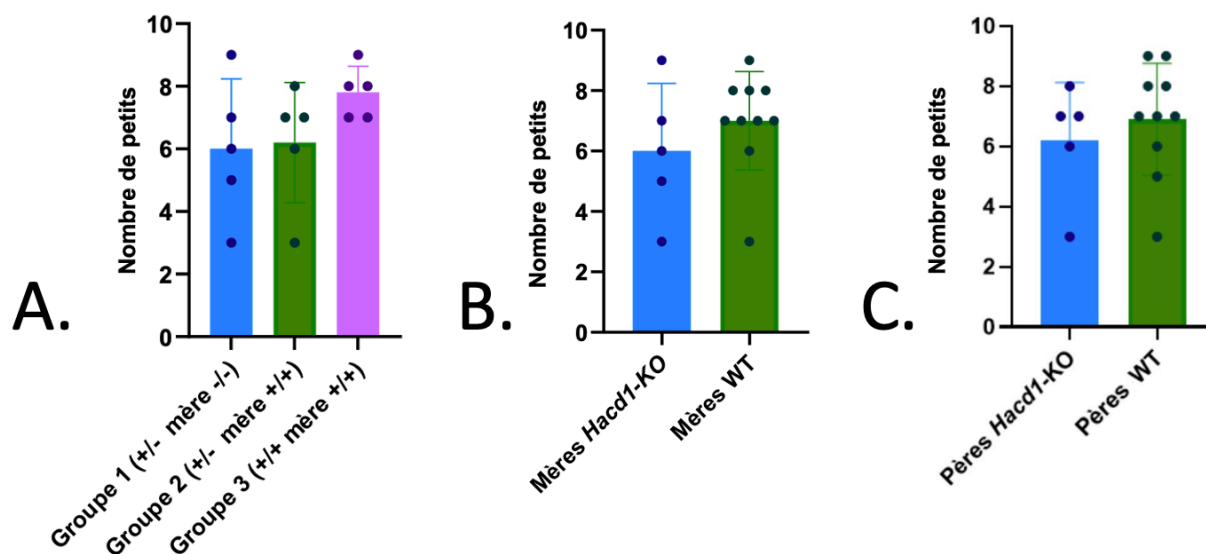
La composition des portées des 15 femelles est reportée dans le Tableau 12. Nous avons étudié le nombre de petits dans les différents groupes. Aucune différence significative n'a été mise en évidence, ni lors de la comparaison des trois groupes (KW, $p = 0,21$) ni lors du regroupement en fonction du génotype des mères (MW, $p = 0,31$) ou des pères (MW, $p = 0,49$) (Figure 25).

Tableau 12 : Nombre de souriceaux dans les différentes portées et composition par sexe de celles-ci.

	Groupe	Génotype des souriceaux	Nombre de petits	Nombre de mâles	Nombre de femelles
670 (-/-)	1	hétérozygotes (+/-)	5	4	1
680 (-/-)	1	hétérozygotes (+/-)	7	3	4
227 (-/-)	1	hétérozygotes (+/-)	6	4	2
237 (-/-)	1	hétérozygotes (+/-)	9	5	4
673 (-/-)	1	hétérozygotes (+/-)	3	2	1
248 (+/+)	2	hétérozygotes (+/-)	7	5	2
226 (+/+)	2	hétérozygotes (+/-)	6	3	3
246 (+/+)	2	hétérozygotes (+/-)	7	4	3
659 (+/+)	2	hétérozygotes (+/-)	8	4	4
174 (+/+)	2	hétérozygotes (+/-)	3	2	1
144 (+/+)	3	Homozygotes (+/+)	9	4	5
143 (+/+)	3	Homozygotes (+/+)	7	2	5
145 (+/+)	3	Homozygotes (+/+)	8	5	3
171 (+/+)	3	Homozygotes (+/+)	8	5	4
170 (+/+)	3	Homozygotes (+/+)	7	6	1

Figure 25 : Nombre de souriceaux par portée, en fonction du génotype des parents.

Nombre de petits à la naissance en fonction du groupe (A), puis résultat groupé en fonction du génotype des mères (B) et du génotype des pères (C) (moyenne +/- écart type).



b. Gestion des problèmes de croissance survenus au cours de l'élevage des souriceaux

Au cours du suivi de poids des souriceaux (les valeurs brutes sont reportées en Annexe 1), la stagnation ou perte de poids d'au moins 2 petits par portée s'est présentée trois fois. Ces trois situations ont été gérées comme prévu dans la saisine du comité éthique et explicité dans le matériel et méthode.

Pour la femelle numéro 673 de génotype *Hacd1-KO* qui avait une portée de trois petits, le petit n°2 a été mis à mort pour les prélèvements à J9. Les deux petits restants ont présenté une perte de poids et du nutrigel fut rajouté. Deux autres petits de génotype WT issue d'une portée présente dans l'animalerie, né le 13 juin donc de 10 jours plus vieux, ont été ajoutés à cette portée. Nous suspicions un défaut de lactation de la femelle dû à une stimulation insuffisante par le nombre trop bas de souriceaux. Après cet ajout, la croissance a repris sans problème, les deux petits ajoutés ne furent pas pris en compte dans la suite de l'étude.

Chez la femelle 237 de génotype *Hacd1-KO* un ajout de nutrigel a été nécessaire car 2 petits sur 8 voyaient leur poids stagner. Une fois le nutrigel donné, la croissance a repris normalement au bout de 24 heures.

Pour la femelle 174 de génotype WT qui n'avait que 3 petits, afin d'éviter le problème survenu avec la femelle 673, il a été décidé de ne pas prélever de souriceaux à J9. Toutefois, les trois petits ont commencé à perdre du poids. A J11 de lactation la décision fut prise de placer du nutrigel et 2 autres petits ont été ajoutés, les numéro 7 et 8 de la femelle 171 WT qui étaient à J16 de lactation. Les problèmes de pertes de poids furent résolus ainsi. Les deux petits ajoutés sont à partir de J16 exclus des données analytiques.

Un dernier problème est survenu au cours du suivi du poids des souriceaux. Chez la femelle 170 de génotype WT, un petit (le numéro 5) sur une portée de 7 a commencé à perdre du poids à J9 de lactation et a été retrouvé mort à J12. Aucun autre problème n'est à signaler dans cette portée, les raisons de la mort de ce souriceau nous sont inconnues.

c. Comparaison de l'évolution du poids des souriceaux

Nous avons tracé la courbe de croissance des souriceaux en fonction du groupe d'étude. Les trois courbes ont sensiblement la même forme. On observe que la croissance est en deux parties, une première croissance de J4 à J18 puis un point d'inflexion à J18 et ensuite, une croissance plus rapide (Figure 26). Puis nous avons tracé les graphiques de comparaison du poids des souriceaux en fonction du groupe d'étude pour le jour 4 (premier jour de pesée), le jour 10 (jour moyen où nous avons prélevé un petit), le jour 13 (jour moyen de pic de prise de poids des femelles), le jour 18 (jour où on observe une inflexion sur les courbes de croissance des souriceaux) et au jour 28 (le dernier jour de pesée avant le sevrage) (Figure 26).

Aucune différence significative n'est mise en évidence à J4 (KW, $p = 0,11$) (Figure 27A).

Une différence significative est mise en évidence à J10 (KW, $p = 0,0013$). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 2 (MW, $p = 0,0079$) et entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p = 0,0004$) mais pas entre les groupes 2 et 3 (MW, $p = 0,38$) (Figure 27B).

Une différence significative est mise en évidence à J13 (KW, $p = 0,0011$). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 2 (MW, $p = 0,013$) et entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p < 0,0001$) mais pas entre les groupes 2 et 3 (MW, $p = 0,74$) (Figure 27C).

Une différence significative est mise en évidence à J18 (KW, $p < 0,0001$). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 2 (MW, $p = 0,0091$), entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p < 0,0001$) et entre les groupes 2 et 3 (MW, $p = 0,0023$) (Figure 27D).

Une différence significative est mise en évidence à J28 (KW, $p = 0,0010$). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 2 (MW, $p = 0,0006$), et entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p = 0,0016$) mais pas entre les groupes 2 et 3 (MW, $p = 0,77$) (Figure 27E).

Figure 26 : Courbe de poids des souriceaux du jour 4 de lactation au jour de sevrage J28.

Moyenne +/- écart type.

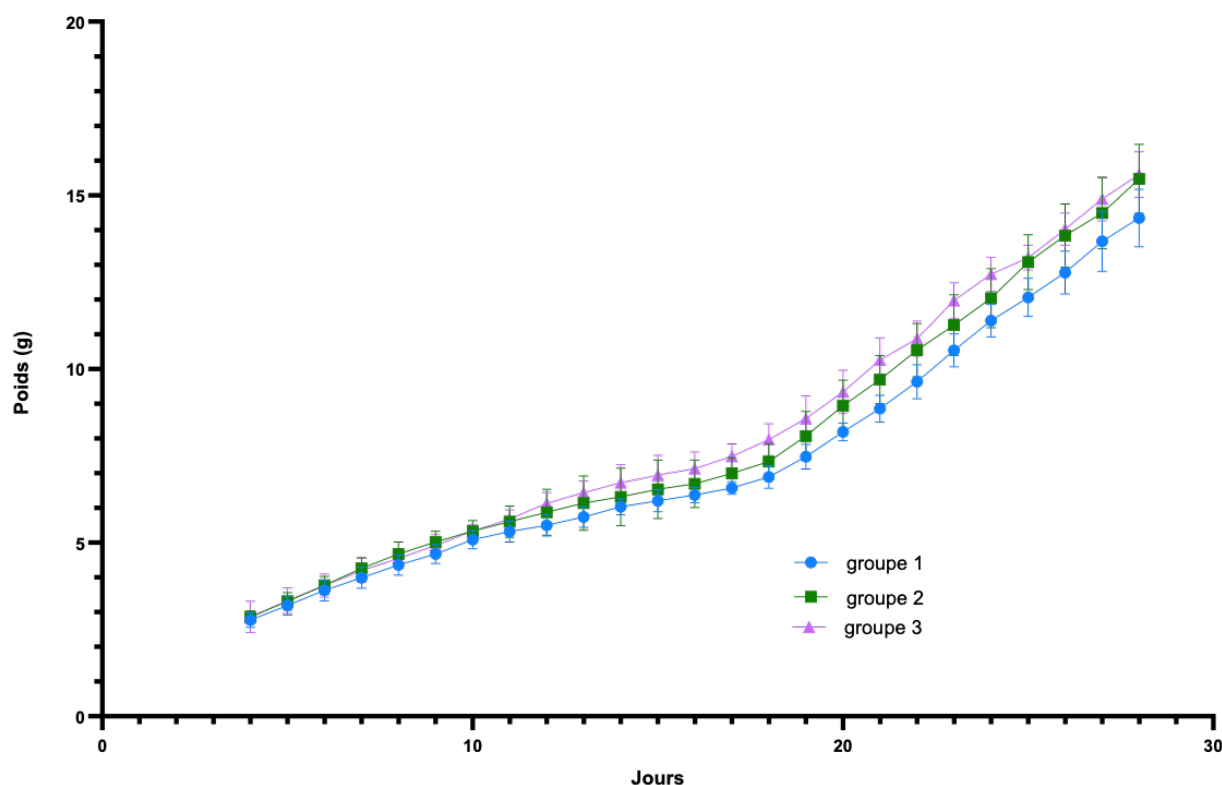
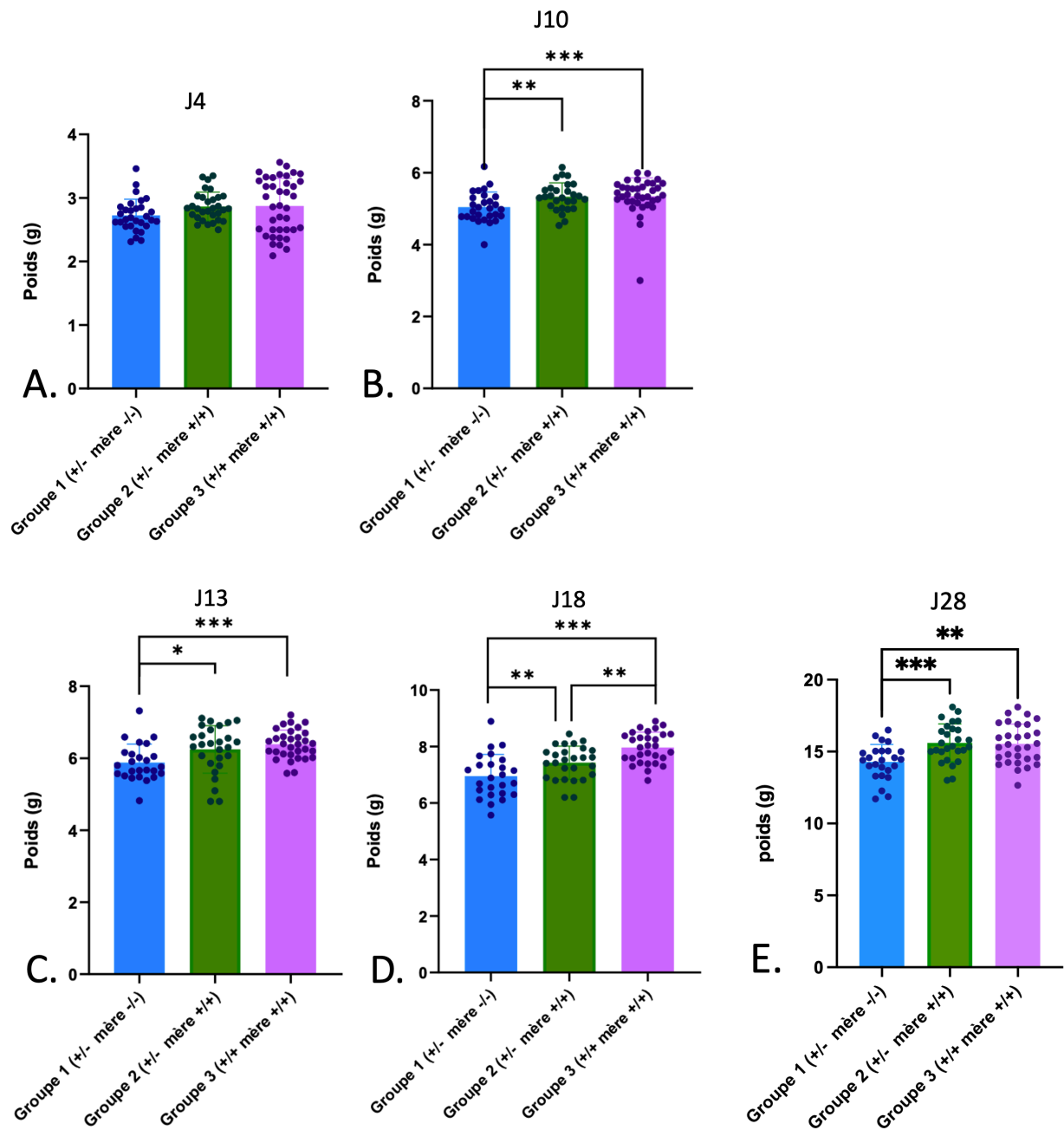


Figure 27 : Comparaison du poids des souriceaux en fonction du groupe d'étude à différents jours de lactation.

Graphique de comparaison des poids des souriceaux à J4 (A), à J10 (B), à J13 (C) à J18 (D) et à J28 (E) (moyenne +/- écart type).



C. Évolution du poids des mères au cours de la lactation

a. Évolution du poids des mères au cours de la lactation en fonction du groupe

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux données récoltées chez les mères lors de la lactation. Tout d'abord, nous avons tracé les différentes courbes de suivi des poids (Figure 28). Les courbes ont des tracés sensiblement identiques, d'abord une phase de croissance légère jusqu'à J13 (le pic de poids). Ensuite une phase de perte de poids jusqu'à J21-22 et enfin une phase de stabilisation du poids jusqu'au sevrage. Puis, nous avons tracé différents graphiques de comparaison du poids des mères en fonction du groupe d'étude, au jour 4 (le premier jour de pesée post mise-bas), au jour 13 (qui semble d'après les courbes de la Figure 28 le pic de la prise de poids) et au jour 28 (jour du sevrage des souriceaux) (Figure 28).

Une différence significative est mise en évidence à J4 (KW, $p = 0,0013$). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p = 0,016$) mais pas de différence entre le groupe 1 et le groupe 2 (MW, $p = 0,151$), ni entre les groupes 2 et 3 (MW, $p = 0,0952$) (Figure 29A).

Une différence significative est mise en évidence à J13 (KW, $p = 0,0003$). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p = 0,0079$) et entre le groupe 2 et le groupe 3 (MW, $p = 0,0079$) mais aucune différence entre les groupes 1 et 2 (MW, $p = 0,1508$) (Figure 29B).

Une différence significative est mise en évidence à J28 (au sevrage) (KW, $p = 0,0003$). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 2 (MW, $p = 0,0317$), entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p = 0,0079$) et entre le groupe 2 et le groupe 3 (MW, $p = 0,0317$) (Figure 29C).

Figure 28 : Courbe du poids des mères en fonction du temps au cours de l'allaitement.

Moyenne +/- écart type.

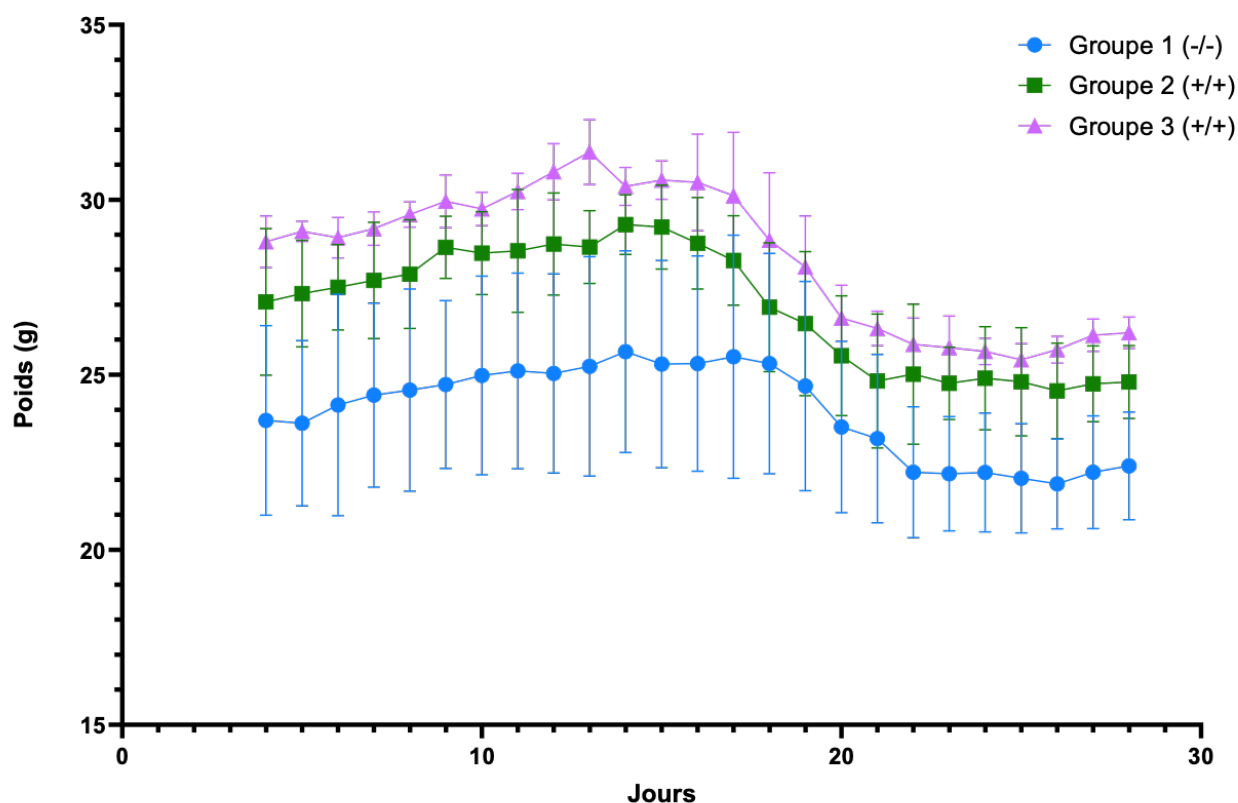
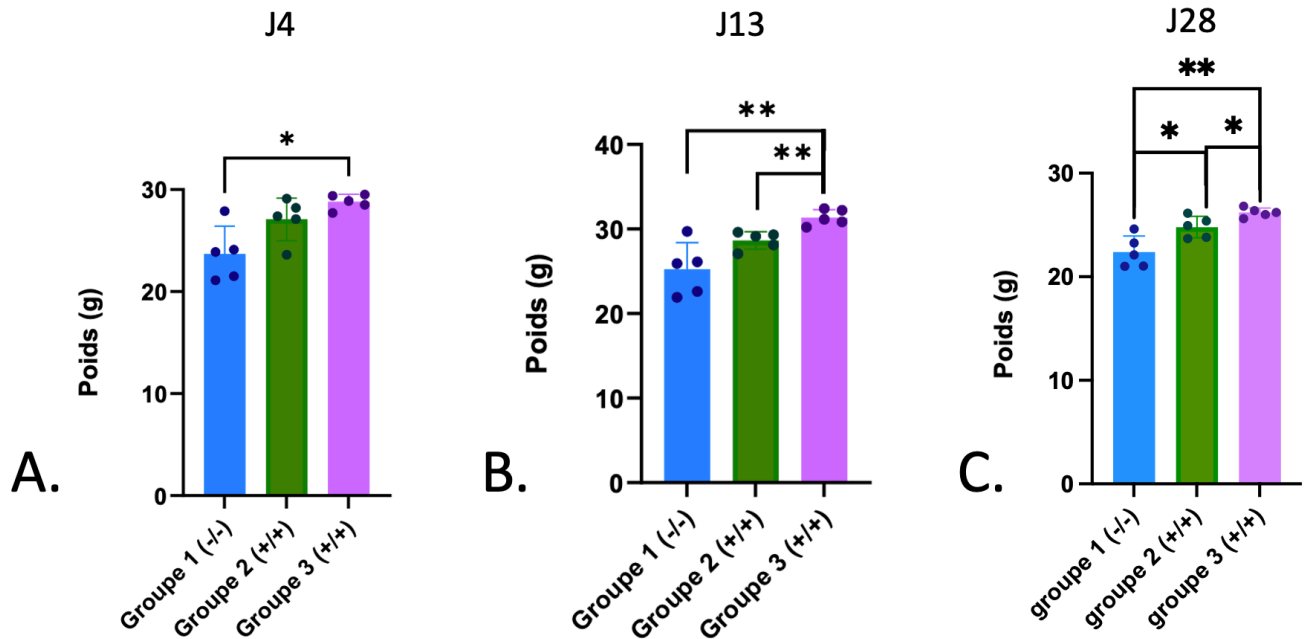


Figure 29 : Comparaison du poids des mères en fonction du groupe d'étude au cours de la lactation.

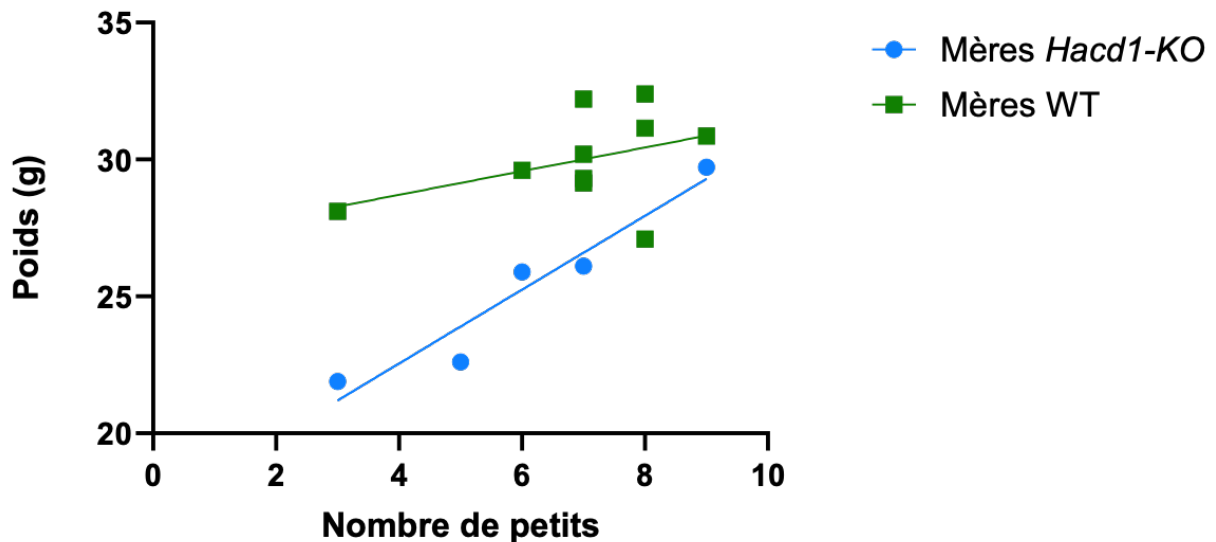
Graphique du poids des femelles en fonction du groupe d'étude à J4 (A), à J13 (B) et à J28 (C) (moyenne +/- écart type).



b. Corrélation entre l'évolution du poids des mères et le nombre de petits

Afin de voir s'il y avait une relation entre le nombre de petits et la prise de poids des femelles chez les femelles *Hacd1*-KO et chez les femelles WT, nous avons construit la droite de régression du poids des femelles à J13 en fonction du nombre de petits dans la portée. Pour les femelles *Hacd1*-KO, une droite de régression avec un R carré significatif ($R^2 = 0,92$) a pu être tracée mais aucune corrélation n'a été retrouvée pour les femelles WT ($R^2 = 0,17$) (Figure 30).

Figure 30 : Poids des mères à J13 en fonction du nombre de petits par portée.



c. Comparaison de l'anabolisme absolu et relatif des mères par groupe d'étude

Nous avons calculé l'anabolisme absolu (poids à J13 – poids à l'accouplement) et relatif (anabolisme absolu/poids à l'accouplement). Les résultats des calculs sont présentés dans le Tableau 13. Les graphiques de comparaison de l'anabolisme absolu et relatif sont présentés en Figure 32. En valeur absolue, une différence significative entre les groupes est mise en évidence (KW, $p = 0,0073$) (Figure 31A). Les tests deux à deux montrent une différence significative entre le groupe 1 et le groupe 3 (MW, $p = 0,032$), et entre le groupe 2 et le groupe 3 (MW, $p = 0,0079$) mais aucune différence entre les groupes 1 et 2 (MW, $p = 0,33$) (Figure 31A). En valeur relative, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois groupes (KW, $p = 0,177$) (figure 31B).

Puis, nous avons calculé l'anabolisme entre le jour 4 et le jour 13, pour étudier l'effet uniquement de la lactation. Les résultats des calculs sont présentés dans le Tableau 13. Les graphiques de comparaison de l'anabolisme absolu et relatif sont présentés en Figure 32. Aucune différence significative entre les groupes n'a été mise en évidence, pour l'anabolisme absolu (KW, $p = 0,37$) (figure 32A) ou pour l'anabolisme relatif (KW, $p = 0,52$) (figure 32B).

Enfin, afin d'étudier s'il y avait une relation entre le nombre de petits et l'anabolisme relatif chez les femelles *Hacd1*-KO et chez les femelles WT, nous avons construit une droite de régression de l'anabolisme relatif des femelles à J13 en fonction du nombre de petits dans la portée (Figure 33). Aucune des droites de régression ne possède un R carré significatif pour l'anabolisme depuis l'accouplement, Le R2 est de 0,84 pour les femelles *Hacd1*-KO, de 0,59 pour les femelles WT (Figure 33A). Pour l'anabolisme depuis J4, le R2 est de 0,40 pour les femelles *Hacd1*-KO, de 0,29 pour les femelles WT (Figure 33B).

Tableau 13 : Calcul de l'anabolisme chez les femelles, de l'accouplement à J13 et de J4 à J13.

Les masses sont exprimées en gramme, acc = accouplement dans la légende du tableau

ID mère	Groupe	masse accouplement (g)	Masse j4 (g)	masse J13 (g)	Anabolisme absolu J13-acc	Anabolisme absolu J13-J4	Anabolisme relatif acc-J13	Anabolisme relatif J13-J4
670 (-/-)	1	15,1	21,5	22,6	7,5	1,1	49,7	5,1
680 (-/-)	1	16,9	24,1	26,1	9,2	2	54,4	8,3
227 (-/-)	1	17,8	23,9	25,9	8,1	2	45,5	8,4
673 (-/-)	1	15,5	21,1	21,9	6,4	0,8	41,3	3,8
237 (-/-)	1	18,8	27,9	29,72	10,92	1,82	58,1	6,5
248 (+/+)	2	19,6	27,4	29,3	9,7	1,9	49,5	6,9
226 (+/+)	2	20,9	29,1	29,6	8,7	0,5	41,6	1,7
659 (+/+)	2	17,3	23,6	27,09	9,79	3,49	56,6	14,8
246 (+/+)	2	18,9	28,2	29,15	10,25	0,95	54,2	3,4
174 (+/+)	2	20	27,1	28,1	8,1	1	40,5	3,7
144 (+/+)	3	20,2	28,9	30,86	10,66	1,96	52,8	6,8
143 (+/+)	3	19,3	29,4	30,2	10,9	0,8	56,5	2,7
145 (+/+)	3	19,4	27,7	31,15	11,75	3,45	60,6	12,5
171 (+/+)	3	21	29,5	32,2	11,2	2,7	53,3	9,2
170 (+/+)	3	20,1	28,5	32,4	12,3	3,9	61,2	13,7

Figure 31 : Anabolisme absolu et relatif entre l'accouplement et le jour 13 de lactation.

Graphiques de l'anabolisme absolu (A) et relatif (B) entre l'accouplement et le jour 13 de lactation en fonction du groupe d'étude (moyenne +/- écart type).

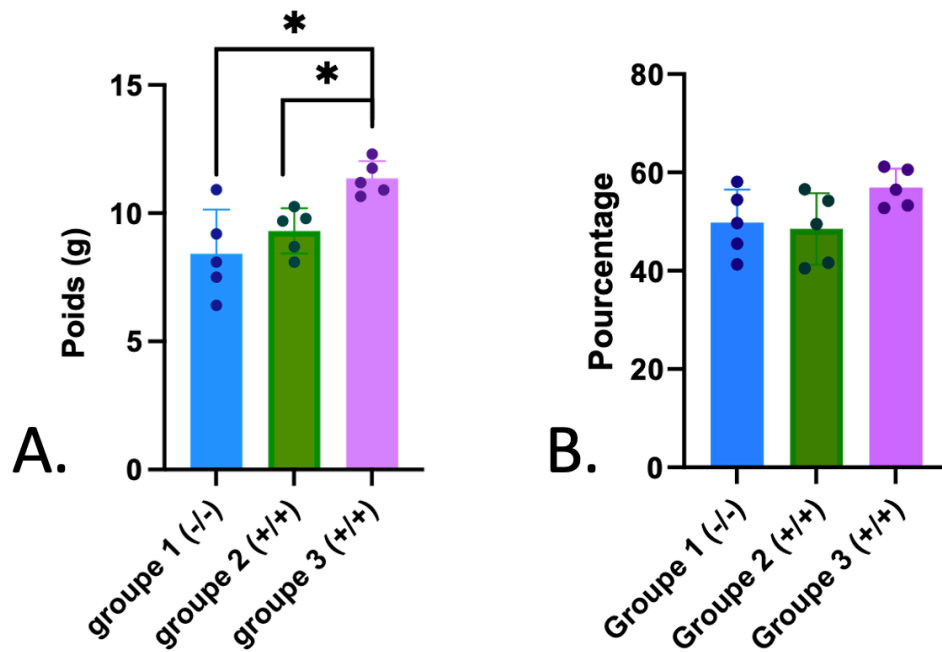


Figure 32 : Anabolisme absolu et relatif entre le jour 4 et le jour 13 de lactation.

Graphique de l'anabolisme absolu (A) et relatif (B) entre le jour 4 et le jour 13 de lactation en fonction du groupe d'étude (moyenne +/- écart type).

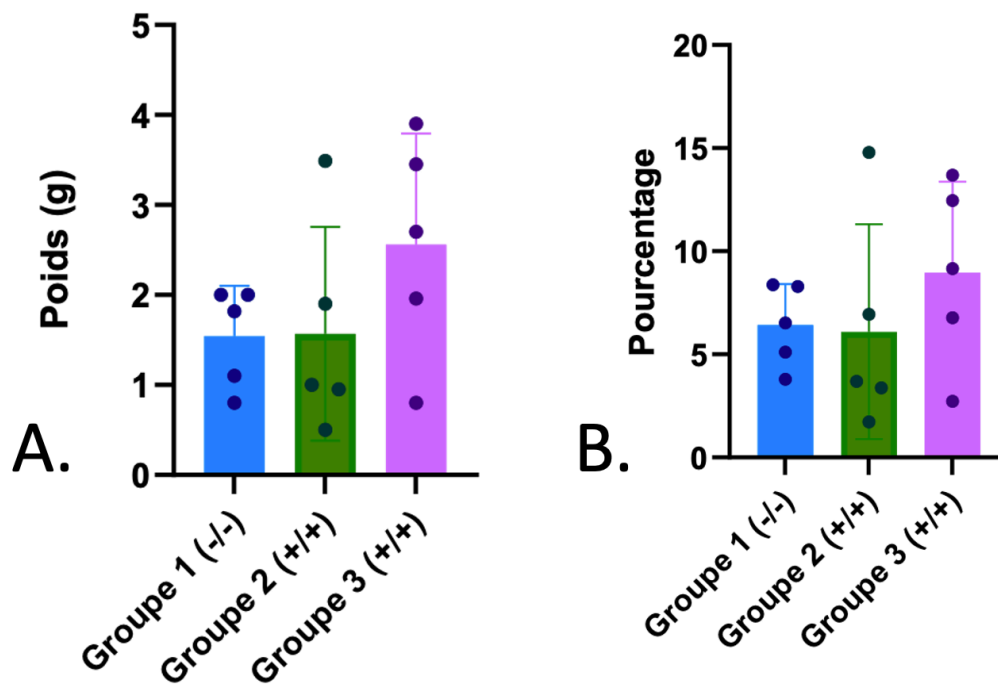
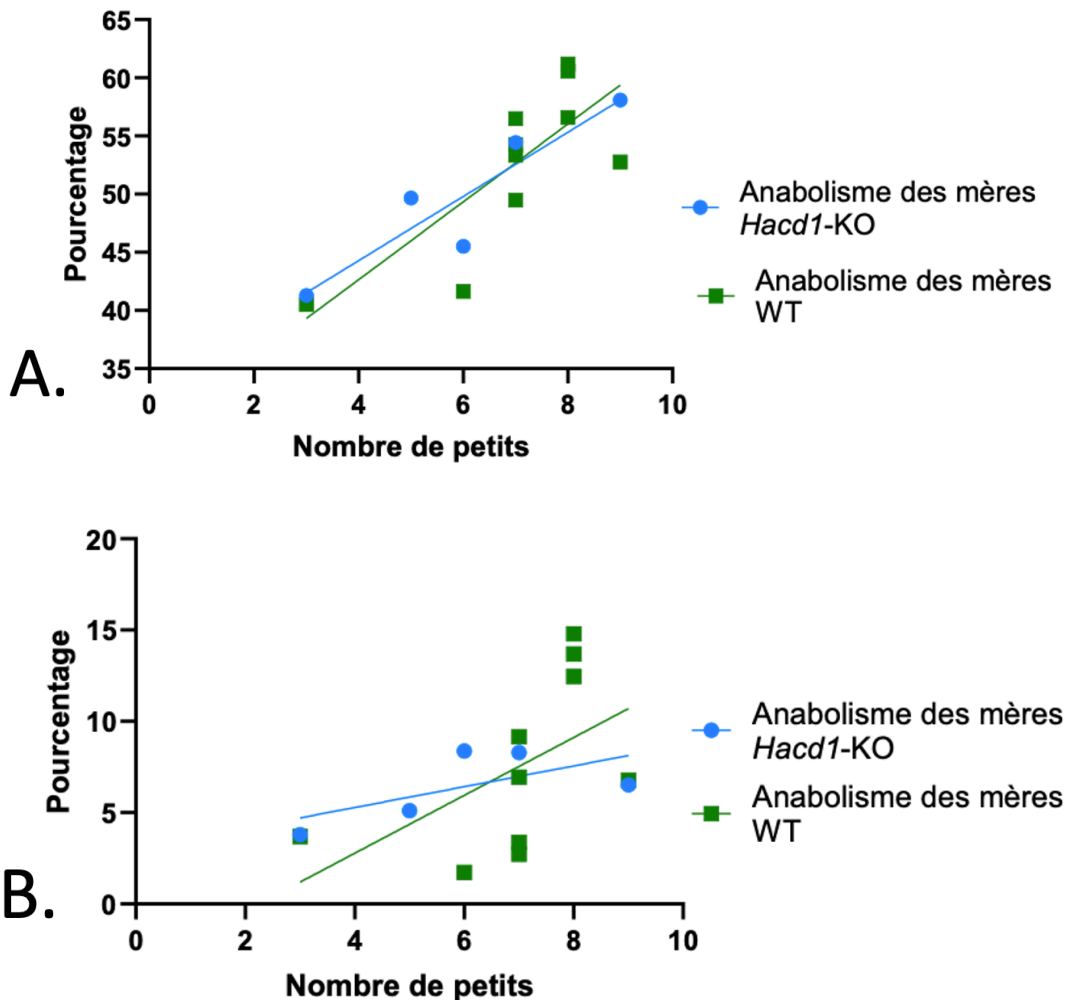


Figure 33 : Anabolisme relatif des mères en fonction du nombre de petits par portée.

Graphiques de l'anabolisme relatif entre l'accouplement et le jour 13 de lactation en fonction du nombre de petits par portée (A) et de l'anabolisme relatif entre le jour 4 et le jour 13 de lactation en fonction du nombre de petits par portée (B).



D. Paramètres des souriceaux

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux données obtenues au cours de la dissection des souriceaux euthanasiés entre J9 et J11 au moment du pic de lactation.

a. Poids et glycémie

Le premier graphique présente le poids des souriceaux au moment de la dissection ; pour chaque portée, seul le petit euthanasié est pris en compte. Aucune différence significative de poids entre les groupes n'a été mise en évidence (KW, $p = 0,50$) (Figure 34).

Une valeur de la glycémie des souriceaux a été prise au moment de l'euthanasie. Le même jour, une valeur de la glycémie de la mère a été mesurée. Aucune différence significative entre les groupes n'a été mise en évidence pour la glycémie des souriceaux (KW, $p = 0,64$) (Figure 35A), ni pour celle des mères (KW, $p = 0,67$) (figure 35B).

Figure 34 : Poids des souriceaux prélevés à J9-J11 en fonction du groupe d'étude.

Moyenne +/- écart type.

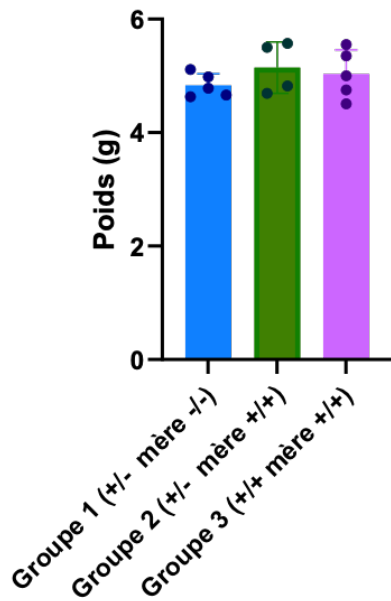
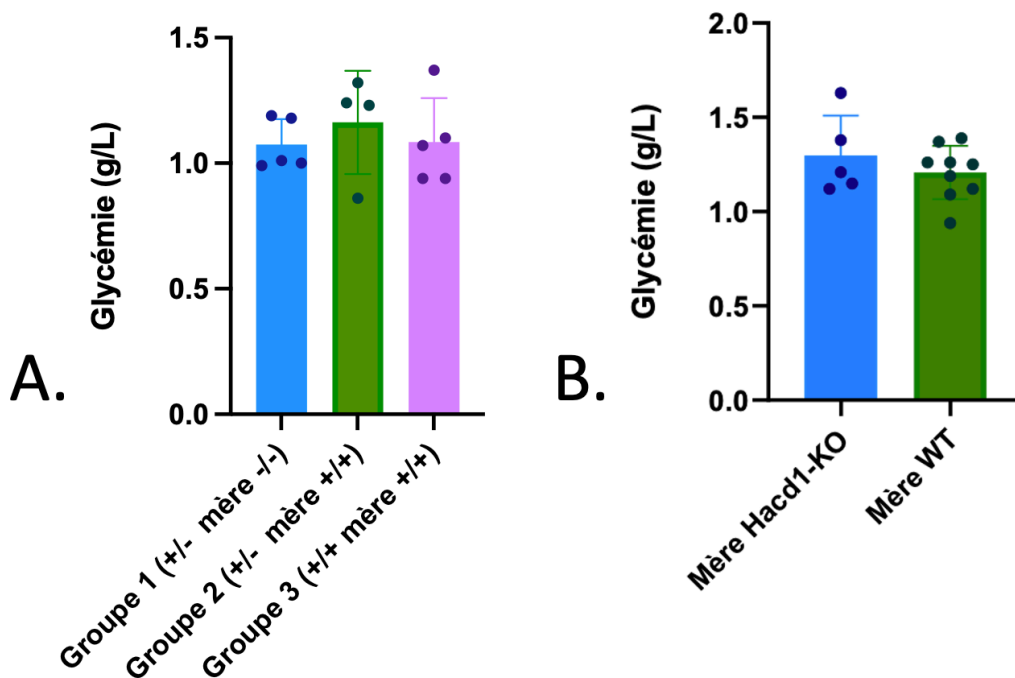


Figure 35: Glycémie des mères et des souriceaux à J9-J11.

A. Glycémie des souriceaux en fonction du groupe d'étude à J9-J11. **B.** Glycémie des mères au moment du prélèvement du souriceau, en fonction de leur génotype (moyenne +/- écart type).



b. Poids des organes

Les figures suivantes présentent le poids des différents organes sous forme de graphiques. Les résultats bruts sont présentés en Annexe 2.

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes pour le poids du foie (KW, $p = 0,18$) (Figure 36A), du rein gauche (KW, $p = 0,35$) (Figure 36B), du cœur (KW, $p = 0,34$) (Figure 36C) et du contenu stomacal (KW, $p = 0,35$) (figure 36D).

Nous avons aussi étudié le poids du contenu stomacal en fusionnant les groupes 2 et 3, afin d'étudier l'effet du génotype de la mère seule. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le groupe 1 et les groupes 2 et 3 réunis (MW, $p = 0,19$) (figure 36E).

Le dernier graphique présente la taille du tibia des souriceaux. Aucune différence significative sur la taille du tibia n'a été mise en évidence entre les groupes (KW, $p = 0,84$) (figure 37).

Figure 36 : Poids de différents organes de souriceaux prélevés à J9-J11.

Graphiques représentant le poids du foie (A) du rein gauche (B) et du cœur (C) en fonction du groupe d'étude chez les souriceaux, ainsi que le poids du contenu stomacal des souriceaux en fonction du groupe d'étude (D) et du génotype des mères (E) (moyenne +/- écart type).

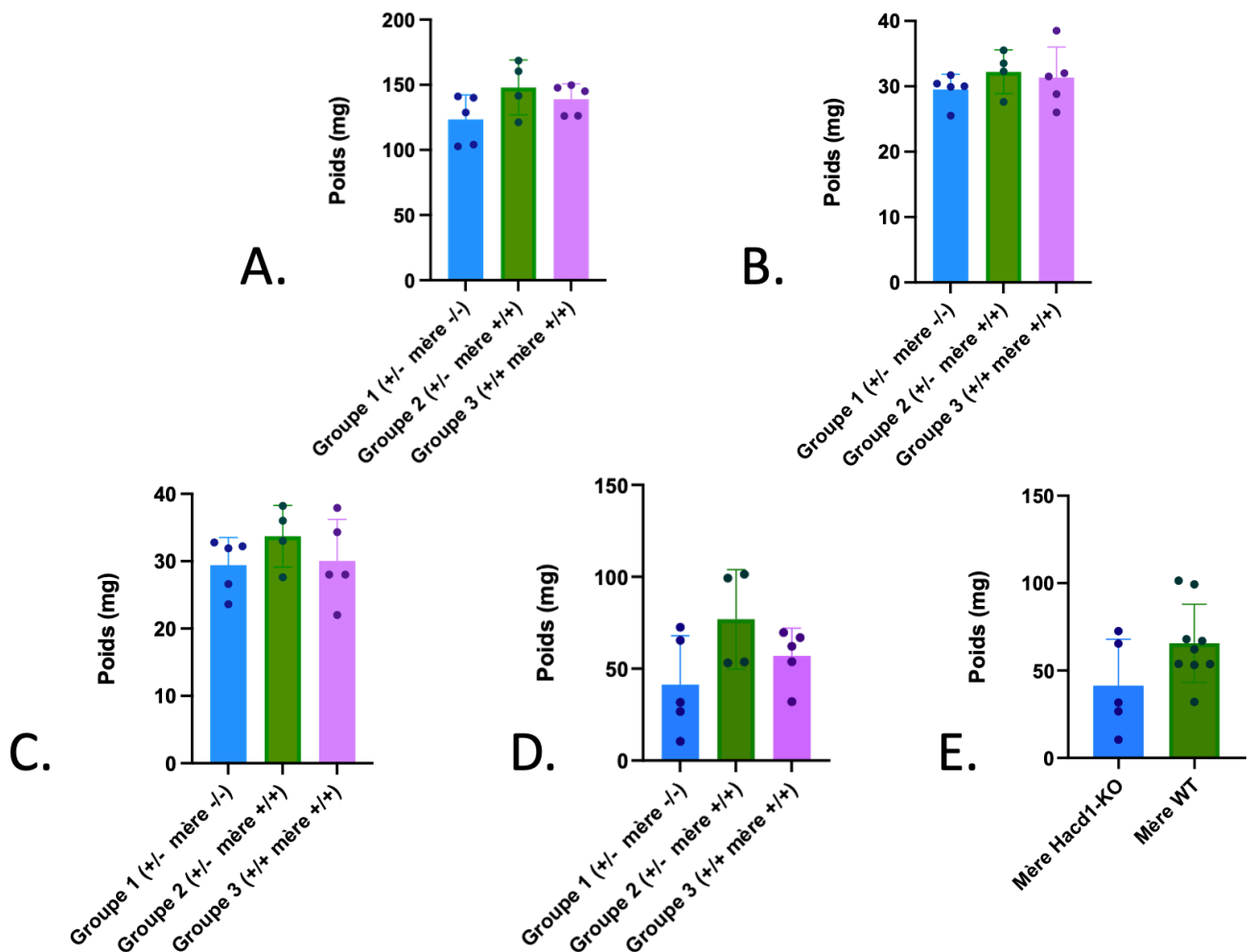
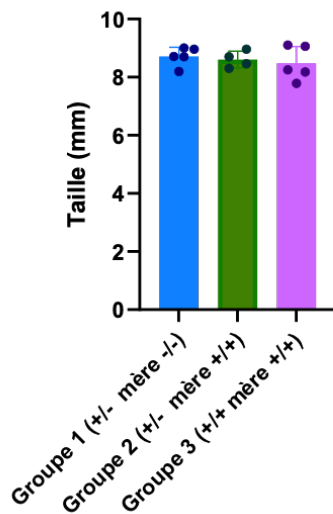


Figure 37 : Taille du tibia droit des souriceaux prélevés à J9-J11.

Moyenne +/- écart type.



E. Prélèvements des mères au sevrage

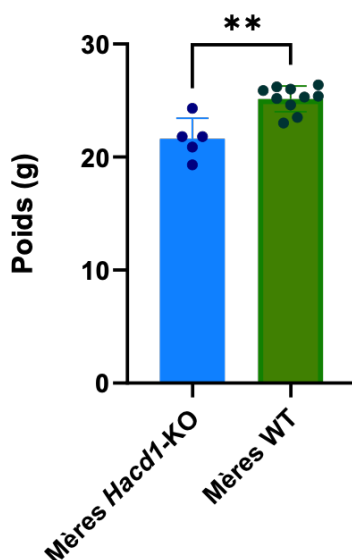
Dans cette partie, nous nous intéresserons aux données fournies par la dissection des mères réalisée au moment du sevrage.

a. Poids des mères

Le premier graphique présente le poids des mères avant la dissection. Les femelles du groupe 1 de génotype *Hacd1*-KO étaient en moyenne significativement plus légères que les femelles des groupes 2 et 3 de génotype WT (MW, $p = 0,0023$) (Figure 38).

Figure 38 : Poids des mères au sevrage en fonction de leur génotype.

Moyenne +/- écart type.



b. Poids des organes

La figure suivante (Figure 39) présente les différents résultats des organes pesés lors de la dissection sous forme de graphique. Les résultats bruts sont présentés en Annexe 3. Aucune différence significative n'a été mise en évidence selon le génotype des mères pour le foie (MW, $p = 0,25$) (Figure 39A) et le cœur (MW, $p = 0,79$) (Figure 39B). Les poids du rein, du tissu adipeux et du muscle gastrocnémien étaient en moyenne significativement plus bas chez les femelles *Hacd1*-KO que chez les femelles WT (MW, $p = 0,029$, $p = 0,008$, $p = 0,0007$ respectivement) (Figure 39C-E).

Le dernier graphique présente la taille du tibia des mères. Aucune différence significative sur la taille des tibias n'a été mise en évidence selon le génotype des mères (KW, $p = 0,17$) (figure 40).

Figure 39 : Poids des différents organes des mères au sevrage en fonction du génotype.

Graphiques représentant le poids du foie (A), du rein gauche (B), du cœur (C), du tissu adipeux (D) et du muscle gastrocnémien (E) chez les femelles au sevrage, en fonction de leur génotype (moyenne +/- écart type).

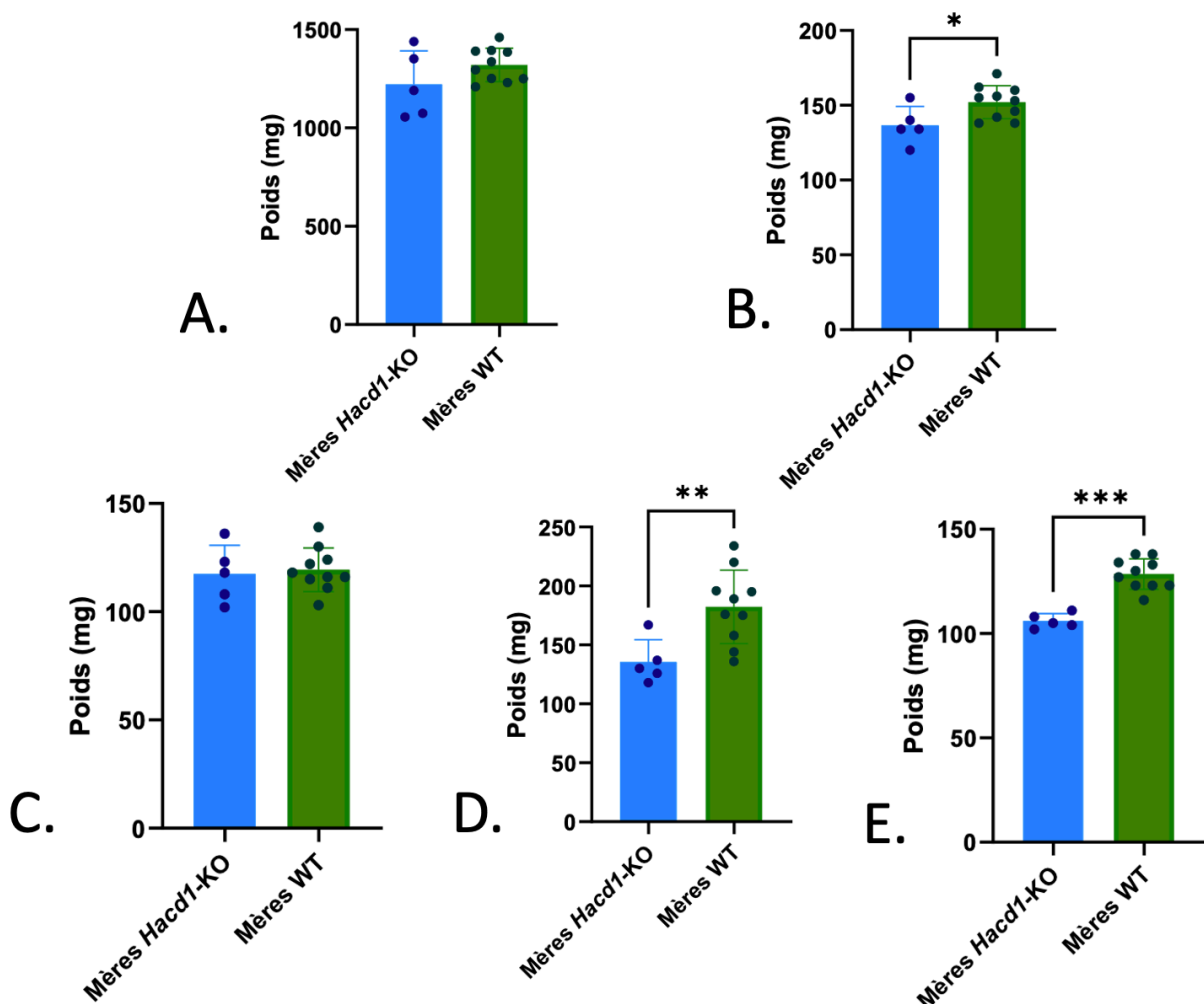
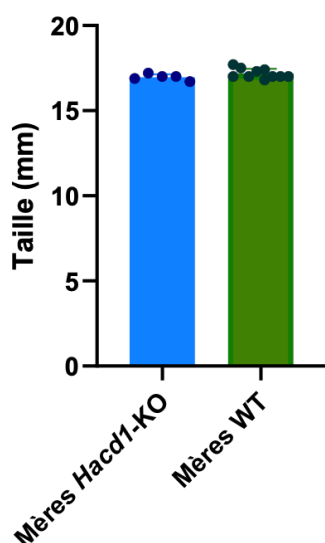


Figure 40 : Taille du tibia droit des mères au sevrage en fonction de leur génotype.

Moyenne +/- écart type.



F. Étude de la composition lipidique du lait

Dans cette dernière partie, nous présentons les résultats de l'analyse lipidomique du lait contenu dans l'estomac des souriceaux. Les tableaux fournis par la plateforme de lipidomique présentait les résultats pour 45 acides gras classés en trois catégories SFA, MUFA et PUFA. Trente-deux des acides gras étaient absents de tous les échantillons et trois PUFA étaient présents mais en quantité strictement identique entre les individus. Aucune étude statistique n'a donc été effectuée sur ces trente-cinq acides gras. Les résultats bruts sont présentés en Annexe 4.

La Figure 41 présente le pourcentage total de chaque catégorie d'acides gras en fonction du génotype des mères. Les tests statistiques deux à deux ne montrent aucune différence significative pour les SFA (MW, $p = 0,28$), les MUFA (MW, $p = 0,59$) et les PUFA (MW, $p = 0,069$).

Les Figures suivantes présentent les résultats pour les SFA (Figure 42), les MUFA (Figure 43) et les PUFA (Figure 44) présents en quantités différentes dans les différents groupes. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour aucun acide gras, ainsi qu'aucune différence significative sur le pourcentage total de SFA, MUFA ou PUFA.

Figure 41 : Pourcentage des différentes catégories d'acides gras en fonction du génotype des mères.

Moyenne +/- écart type.

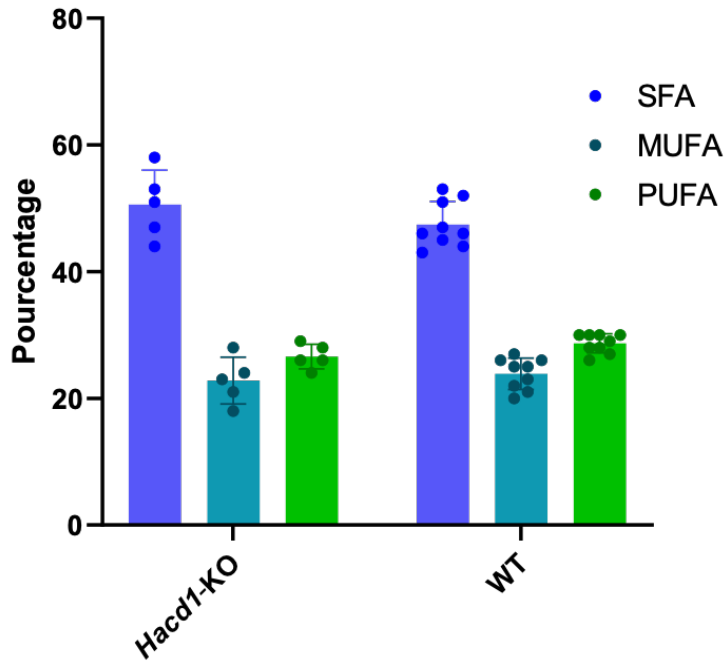


Figure 42 : Pourcentage des différents acides gras saturés dans le lait en fonction du génotype des mères.

Graphique représentant le pourcentage d'acide gras saturés C14:0 (A), de C16:0 (B), et C18:0 (C) dans le lait en fonction du génotype des mères (moyenne +/- écart type).

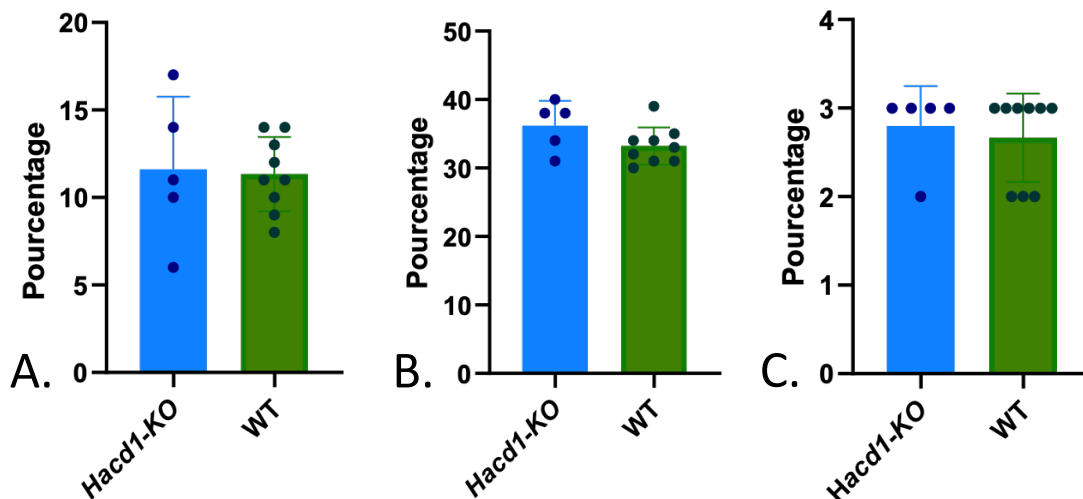


Figure 43 : Pourcentage des différents acides gras mono-insaturés dans le lait en fonction du génotype des mères.

Graphique représentant le pourcentage d'acides gras mono-insaturé C14:1 n-9 (A), de C16:1 n-7 (B), de C18:1 n-7c (C), C18:1 n-7c (D) et C20:1 n-9 (E) dans le lait en fonction du génotype des mères (moyenne +/- écart type).

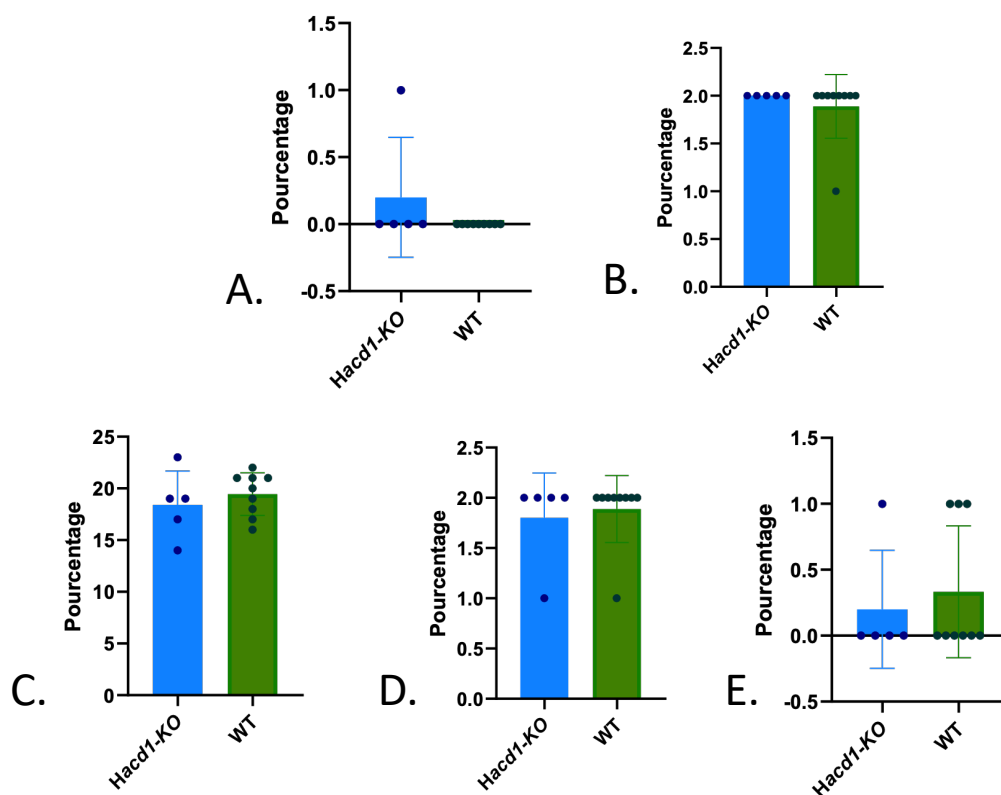
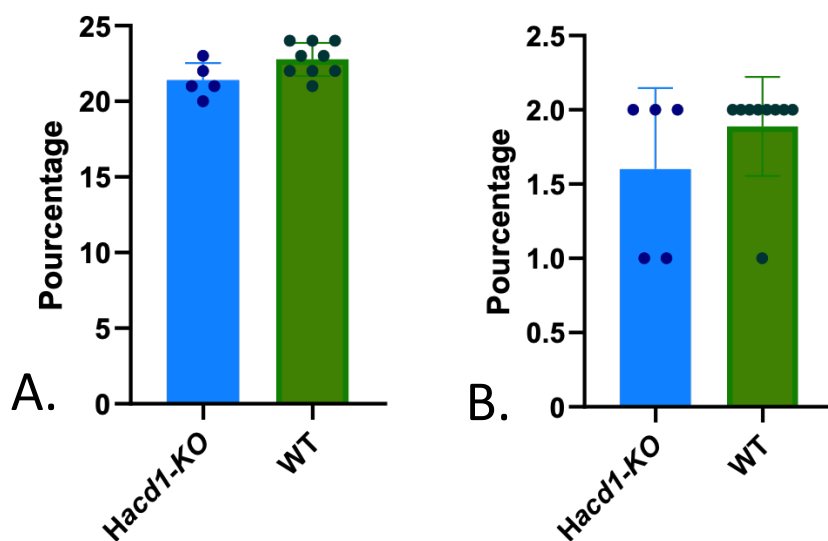


Figure 44 : Pourcentage des différents acides gras poly-insaturés dans le lait en fonction du génotype des mères.

Graphique représentant le pourcentage d'acides gras poly-insaturés C18:2 n-6c (A), et C18:3 n-3 (B) dans le lait en fonction du génotype des mères (moyenne +/- écart type).



4. Discussion

La myopathie liée à HADC1 est une myopathie centronucléaire autosomique récessive, qui a été découverte chez les labradors (Pelé *et al.*, 2005) et chez l'humain (Muhammad *et al.*, 2013). Son étude permet de faire le lien entre la recherche vétérinaire et la recherche humaine. Notre étude sur la gestation et la lactation chez les souris permet d'apporter de premières réponses sur le déroulement de la gestation et la lactation, qui pourraient être intéressantes pour les chiennes ou les femmes atteintes de cette maladie.

Le déroulement des expériences s'est passé sans souci majeur, peu de cannibalisme est à déplorer. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les trois femelles cannibales étaient des femelles WT donc cela n'avait aucun rapport avec la mutation du gène *Hacd1*.

A. Accouplement et gestation

Les individus *Hacd1*-KO utilisés dans notre étude, mâles comme femelles étaient bien significativement plus légers que les individus WT, comme le rapporte la littérature (Blondelle *et al.*, 2015). Les individus adultes utilisés au cours de cette étude étaient donc bien représentatifs de leur génotype. La différence de poids était toujours présente au moment de l'isolement des femelles gestantes (11-12 jours de gestation en moyenne, Figure 25). Mais aucune différence dans le jour d'isolement n'a été mise en évidence. La méthode d'isolement des femelles étant uniquement basée sur la prise de poids, cela montre que la prise de poids relative à la gestation était la même chez les femelles *Hacd1*-KO et les femelles WT.

Toutes nos femelles ont réussi à mener une gestation à terme et sans perdre de poids, ce qui montre que malgré le déficit énergétique lié à la mutation du gène *Hacd1*, les femelles *Hacd1*-KO sont tout à fait capables de mener une gestation à terme.

Au niveau du nombre de souriceaux par portées, aucune différence significative n'était observée, ni avec une mère *Hacd1*-KO, ni avec un père *Hacd1*-KO (Figure 25) montrant que la mutation du gène *Hacd1* chez les mâles comme chez les femelles ne semble pas avoir d'effet sur la fertilité.

B. Évolution du poids des femelles au cours de la lactation.

L'étude du suivi du poids des femelles au cours de la gestation et de la lactation donne des résultats inattendus. En effet, on s'attendait à ce que les femelles *Hacd1*-KO même si elles arrivaient à mener la gestation à bon terme, seraient tout au long de la gestation plus légère que les femelles WT. Cette différence de poids entre individu *Hacd1*-KO et WT était encore présente au moment de l'isolement des femelles gestantes (Figure 24), mais à J4 et J13 cette différence restait présente visuellement (Figure 28) mais n'était plus significative (Figure 29). Cette absence de différence significative souligne une faible différence biologique à ce stade et peut s'expliquer par un manque de puissance statistique dû à la taille de notre échantillon. À J28, on avait une différence de poids entre les 3 groupes, non explicable par la mutation du gène *Hacd1*. Cependant, les données trouvées au sevrage à J28 sont à mettre en regard des données sur le poids des femelles lors de leur dissection quelques jours plus tard (Figure 38), on retrouvait alors une différence entre femelles *Hacd1*-KO et femelles WT. Il est donc possible qu'à J28, la différence significative de poids entre les groupes 2 et 3 soit le fruit du hasard.

Les mesures d'anabolisme ne montrent pas de différence significative entre la prise de poids et le nombre de petits par portée (Figure 33), il y avait cependant une corrélation visuelle entre nombre de petits et la prise de poids pour les femelles *Hacd1*-KO, contrairement aux femelles WT pour lesquelles aucune corrélation ne semblait visible. Il est possible que nous ayons manqué ici de puissance statistique pour révéler un effet direct du nombre de petits sur l'anabolisme de ces femelles *Hacd1*-KO.

Toutefois, l'information la plus importante reste que les femelles *Hacd1*-KO ont réussi à mener leurs portées jusqu'au sevrage, montrant que conduire une lactation n'est pas impossible pour les

individus *Hacd1*-KO. Pour les 2 femelles chez qui des pertes de poids chez les souriceaux ont été observées, il s'agissait des deux plus petites portées de l'étude. Le problème ayant été résolu avec du nutrigel et un ajout d'autres souriceaux pour stimuler la lactation, il semblerait que le faible nombre de petits soit à l'origine du problème, sans effet de la mutation du gène *Hacd1*, les deux femelles étant de génotypes différents.

C. Lactation et croissance des souriceaux

Le suivi du poids des souriceaux met en évidence qu'à partir de J10 de lactation une différence de poids significative apparaissait entre les groupes 1 et 3 ainsi qu'entre les groupes 1 et 2. Les petits issus des femelles *Hacd1*-KO avaient donc une croissance plus faible que les petits issus de mères WT. Toutefois, une différence apparaissait aussi entre les petits des groupes 2 et 3, cette différence était significative qu'à J18 au moment de l'inflexion de la courbe (Figure 23), et semblait d'après la courbe, disparaître à J25. Cela pourrait laisser supposer que la différence de poids entre les souriceaux n'était pas uniquement due aux mères mais pourrait être due au génotype hétérozygote (-/+) des petits des groupes 1 et 2. En effet, si les signes cliniques de la myopathie centronucléaire liée au gène *Hacd1* n'apparaissent que chez les individus homozygotes (Blondelle *et al.*, 2015), au niveau métabolique, les souris hétérozygotes semblent présenter une forme intermédiaire de la maladie (Vandestienne-Ratnam, 2021), c'est peut-être cette forme intermédiaire, uniquement métabolique que nous avons observée ici.

Il est intéressant de noter qu'on ne retrouve pas de différence de poids significative des souriceaux à J10 quand on regarde uniquement les petits prélevés, cela peut s'expliquer par le plus faible nombre d'individus et le fait qu'on ait pris l'individu médian de chaque portée, ce qui effacerait l'effet de l'écart-type.

D. Prélèvements des souriceaux

Aucune différence de glycémie n'a été mise en évidence entre les groupes chez les souriceaux comme chez les mères, le métabolisme énergétique des souris était donc fonctionnel. Aucune différence de poids pour le rein et le cœur et aucune différence au niveau de la taille des tibias des souriceaux n'a été retrouvée, montrant qu'il n'y avait aucun problème de croissance chez les petits issus de mère *Hacd1*-KO. Aucune différence de poids du foie n'a été mise en évidence, donc on peut penser que le métabolisme lipidique fonctionnait correctement chez les souriceaux. De même, nous n'avons pas de différence significative au niveau de la quantité de lait récupérée dans l'estomac des souriceaux, on peut donc penser que les mères *Hacd1*-KO et les mères WT produisaient du lait en quantité identique. Sans que cela ne montre que le lait avait une composition normale, cela montre que les mères produisaient suffisamment de lait et que la tétée se déroulait normalement pour les femelles *Hacd1*-KO.

E. Prélèvements des mères

La dissection des femelles met en évidence, comme on s'y attendait, une masse musculaire, basée sur la mesure du muscle gastrocnémien, plus faible chez les femelles *Hacd1*-KO que chez les femelles WT, ainsi qu'un tissu adipeux plus faible, correspondant à moins de réserves lipidiques, comme cela était attendu par rapport à la littérature (Prola *et al.*, 2021)(Vandestienne-Ratnam, 2021). Aucune différence n'a été mise en évidence sur la taille du tibia, montrant que les souris étaient bien de même taille et que les différences de poids des organes et des muscles ne sont pas due à une différence de taille (Blondelle *et al.*, 2015). Aucune différence de poids n'a été mise en évidence pour le cœur et pour le foie, montrant que les autres gènes *Hacd*, prédominants dans le foie, sont suffisants pour former les réserves lipidiques du foie (Ikeda *et al.*, 2008). Une différence étonnante apparaît concernant le poids du rein. Le rein des femelles *Hacd1*-KO était en moyenne plus petit que celui des femelles WT. *Hacd1* étant peu exprimé dans le rein, où l'on retrouve plutôt *Hacd2* et *Hacd3* (Ikeda *et al.*, 2008) et s'agissant un organe qui joue un faible rôle dans les réserves lipidiques, cette différence ne peut pas être expliquée, dans l'état actuel de nos connaissances sur la mutation du gène *Hacd1*.

F. Composition lipidique du lait

La composition en acides gras du lait des souris WT était sensiblement identique à celle retrouvée dans la littérature, avec juste une proportion d'acide gras C16:0 plus élevée (35-40% contre 28%) par rapport à l'étude de De Peters et al. et moins de C18:1 n-9 par rapport à l'étude de Silverman (20-25% contre 40%). Cela pourrait être due à une composition de l'aliment plus riche en acide gras saturé d'après les hypothèses de l'étude de De Peters et al, sans qu'aucune donnée statistique n'appuie son hypothèse (DePeters *et al.*, 2001) (Silverman *et al.*, 1992). Le DHA (C22:6 n3) et l'EPA (C20:5 n3), acides gras essentiels pour la croissance, sont bien présents dans nos échantillons, mais en quantité infime, inférieure à 1% comme indiqué dans la littérature (Morales *et al.*, 2011). Le lait humain est riche en AA, ici, dans le lait de souris, on retrouve bien de l'AA, en quantité de 1% environ chez chacune des souris.

Globalement, comme nous le supposions aucune différence entre les acides gras du lait n'a été observée, sûrement en raison du fait que les lipides du lait dépendent de l'apport alimentaire et de la synthèse hépatique et locale dans la glande mammaire alors que l'expression d'*Hacd1* est majoritairement retrouvée dans le cœur et les muscles (Blondelle *et al.*, 2015) .

Attention toutefois, les mécanismes de synthèse des acides gras du lait de souris ne sont pas complètement identiques à ceux du lait humain ou de chien, et la composition du lait de ces trois espèces n'est pas totalement identique. Ainsi, même si cette étude tend à dire que la myopathie liée au gène *Hacd1* ne perturbe pas la synthèse des acides gras du lait, ce résultat doit être transféré aux autres espèces avec prudence.

Conclusion

La mutation du gène *HACD1* provoque une myopathie centronucléaire autosomique récessive chez le chien et l'humain. En plus de cette myopathie, il a été observé chez les souris *Hacd1*-KO un déficit énergétique dans les muscles, avec un rendement en ATP plus faible et donc une faiblesse à l'effort et au repos, qui s'accompagne d'une résistance à la prise de poids.

Nous avons posé comme hypothèses que la mutation du gène *Hacd1* pourrait provoquer plusieurs problèmes au cours de la gestation et de la lactation. D'abord elle pourrait provoquer un défaut de fertilité des mâles ou des femelles, qui se traduirait par des portées plus petites. Ensuite que le déficit énergétique pendant la gestation et la lactation pourrait empêcher les femelles *Hacd1*-KO de les mener à terme correctement. On s'attendait à un déficit de croissance des souriceaux issus de mère *Hacd1*-KO mais pas des petits hétérozygotes par rapport aux homozygotes car la myopathie ne se développe que chez les individus homozygotes. Enfin, nous avons supposé que la composition lipidique du lait pourrait être différente chez les individus *Hacd1*-KO car *HACD1* joue un rôle dans l'élongation des VLCFA, qui entrent dans la composition du lait.

Au cours de nos expériences nous avons observé que la fertilité ne semblait pas altérée par la mutation du gène *Hacd1* car la taille des portées n'étaient pas significativement différentes. La mutation du gène *Hacd1* ne semble pas non plus avoir d'effet sur la composition lipidique du lait, ce qui est en accord avec les connaissances sur les lieux de synthèses du lait qui diffèrent des lieux d'expression du gène *Hacd1* ainsi que l'importance de l'alimentation des mères dans la composition en VLCFA du lait.

Ensuite, nous avons vu que les femelles *Hacd1*-KO ont bien tenu la lactation et la gestation et ont su mener leurs portées jusqu'au sevrage sans perte de poids des femelles *Hacd1*-KO. Pour les souriceaux, on observe quand même une petite différence de poids entre les individus issus de mère *Hacd1*-KO par rapport aux individus issus de mère WT, mais aussi entre les individus hétérozygotes et les individus WT montrant sûrement un effet double du métabolisme réduit de la mère et du métabolisme intermédiaire possible des individus hétérozygotes pour le gène *Hacd1* sans que ces différences ne semblent altérer le déroulement de la croissance des souriceaux.

Liste des références bibliographiques

- ABBASI-MOHEB, L., WESTENBERGER, A., ALOTAIBI, M., *et al.* (2021) Biallelic loss-of-function HACD1 variants are a bona fide cause of congenital myopathy. *Clinical Genetics* vol. 99, n° 4, p. 513-518. [https://doi.org/10.1111/cge.13905]
- ADHIHETTY, P.J., UGUCCIONI, G., LEICK, L., *et al.* (2009) The role of PGC-1alpha on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* vol. 297, n° 1, p. C217-225. [https://doi.org/10.1152/ajpcell.00070.2009]
- AKIMOTO, T., POHNERT, S.C., LI, P., *et al.* (2005) Exercise Stimulates Pgc-1 α Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the p38 MAPK Pathway. *Journal of Biological Chemistry* vol. 280, n° 20, p. 19587-19593. [https://doi.org/10.1074/jbc.M408862200]
- AL AMRANI, F., GORODETSKY, C., HAZRATI, L.-N., *et al.* (2020) Biallelic LINE insertion mutation in HACD1 causing congenital myopathy. *Neurology Genetics* vol. 6, n° 3, p. e423. [https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000423]
- ARTALEJO, C.R., ELHAMDANI, A., PALFREY, H.C. (2002) Sustained stimulation shifts the mechanism of endocytosis from dynamin-1-dependent rapid endocytosis to clathrin- and dynamin-2-mediated slow endocytosis in chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* vol. 99, n° 9, p. 6358-6363. [https://doi.org/10.1073/pnas.082658499]
- BAKER, T.G., SUM O, W. (1976) Development of the Ovary and Oogenesis. *Clinics in Obstetrics and Gynaecology* vol. 3, n° 1, p. 3-26. [https://doi.org/10.1016/S0306-3356(21)00330-7]
- BEGGS, A.H., BÖHM, J., SNEAD, E., *et al.* (2010) MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 107, n° 33, p. 14697-14702. [https://doi.org/10.1073/pnas.1003677107]
- BI, P., RAMIREZ-MARTINEZ, A., LI, H., *et al.* (2017) Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science (New York, N.Y.)* vol. 356, n° 6335, p. 323-327. [https://doi.org/10.1126/science.aam9361]
- BITOUN, M., MAUGENRE, S., JEANNET, P.-Y., *et al.* (2005) Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nature Genetics* vol. 37, n° 11, p. 1207-1209. [https://doi.org/10.1038/ng1657]
- BLEY, T., GAILLARD, C., BILZER, T., *et al.* (2002) Genetic aspects of Labrador Retriever myopathy. *Research in Veterinary Science* vol. 73, n° 3, p. 231-236. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288(02)00034-6]
- BLONDELLE, J., OHNO, Y., GACHE, V., *et al.* (2015) HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *Journal of Molecular Cell Biology* vol. 7, n° 5, p. 429-440. [https://doi.org/10.1093/jmcb/mjv049]
- BLOT, S., TIRET, L., DEVILLAIRE, A., *et al.* (2002) Phenotype description of a canine centronuclear myopathy.
- BÖHM, J., VASLI, N., MAURER, M., *et al.* (2013) Altered Splicing of the BIN1 Muscle-Specific Exon in Humans and Dogs with Highly Progressive Centronuclear Myopathy. *PLoS genetics* vol. 9, p. e1003430. [https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003430]
- CHARRIN, S., LATIL, M., SOAVE, S., *et al.* (2013) Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. *Nature Communications* vol. 4, n° 1, p. 1674. [https://doi.org/10.1038/ncomms2675]
- CHOI, S.-Y., HUANG, P., JENKINS, G.M., *et al.* (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nature Cell Biology* vol. 8, n° 11, p. 1255-1262. [https://doi.org/10.1038/ncb1487]
- CORIA-AVILA, G.A., PFAUS, J.G., HERNANDEZ, M.E., *et al.* (2004) Timing between ejaculations changes paternity success. *Physiology & Behavior* vol. 80, n° 5, p. 733-737. [https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.12.008]
- DARIN, N., TULINIUS, M. (2000) Neuromuscular disorders in childhood: a descriptive epidemiological study from western Sweden. *Neuromuscular disorders: NMD* vol. 10, n° 1, p. 1-9. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966(99)00055-3]
- DEAN, M.D. (2013) Genetic Disruption of the Copulatory Plug in Mice Leads to Severely Reduced Fertility. *PLoS Genetics* vol. 9, n° 1, p. e1003185. [https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003185]
- DECATANZARO, D. (1991) Duration of mating relates to fertility in mice. *Physiology & Behavior* vol. 50, n° 2, p. 393-395. [https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90084-2]
- DENIC, V., WEISSMAN, J.S. (2007) A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* vol. 130, n° 4, p. 663-677. [https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.031]

- DEPETERS, E.J., GERMAN, J.B., TAYLOR, S.J., *et al.* (2001) Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil. *Journal of Dairy Science* vol. 84, n° 4, p. 929-936. [[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74550-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74550-X)]
- ESTEP, D.Q., LANIER, D.L., DEWSBURY, D.A. (1975) Copulatory behavior and nest building behavior of wild house mice (*Mus musculus*). *Animal Learning & Behavior* vol. 3, n° 4, p. 329-336. [<https://doi.org/10.3758/BF03213455>]
- FELIU-PASCUAL, A.L., SHELTON, G.D., TARGETT, M.P., *et al.* (2006) Inherited myopathy of great Danes. *Journal of Small Animal Practice* vol. 47, n° 5, p. 249-254. [<https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2006.00073.x>]
- FIRMAN, R.C., SIMMONS, L.W. (2008) The frequency of multiple paternity predicts variation in testes size among island populations of house mice. *Journal of Evolutionary Biology* vol. 21, n° 6, p. 1524-1533. [<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01612.x>]
- GÖRS, S., KUCIA, M., LANGHAMMER, M., *et al.* (2009) Technical note: Milk composition in mice--methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. *Journal of Dairy Science* vol. 92, n° 2, p. 632-637. [<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1563>]
- HALL, J.E., HALL, M.E. (2020) Guyton and Hall Textbook of medical physiology, 14th. Philadelphia, Elsevier.
- HANDSCHIN, C., CHIN, S., LI, P., *et al.* (2007) Skeletal Muscle Fiber-type Switching, Exercise Intolerance, and Myopathy in PGC-1 α Muscle-specific Knock-out Animals*. *Journal of Biological Chemistry* vol. 282, n° 41, p. 30014-30021. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M704817200>]
- HAQUE, M.E., MCINTOSH, T.J., LENTZ, B.R. (2001) Influence of lipid composition on physical properties and peg-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: « nature's own » fusogenic lipid bilayer. *Biochemistry* vol. 40, n° 14, p. 4340-4348. [<https://doi.org/10.1021/bi002030k>]
- HUGHES, M.I., HICKS, E.M., NEVIN, N.C., *et al.* (1996) The prevalence of inherited neuromuscular disease in Northern Ireland. *Neuromuscular Disorders* vol. 6, n° 1, p. 69-73. [[https://doi.org/10.1016/0960-8966\(94\)00017-4](https://doi.org/10.1016/0960-8966(94)00017-4)]
- IKEDA, M., KANAO, Y., YAMANAKA, M., *et al.* (2008) Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS letters* vol. 582, n° 16, p. 2435-2440. [<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.06.007>]
- JABBARPOUR, N., POORSHIRI, B., SAEI, H., *et al.* (2023) Identification of a novel mutation in the HADC1 gene in an Iranian family with autosomal recessive congenital myopathy, with fibre-type disproportion. *Journal of Genetics* vol. 102, n° 1, p. 18. [<https://doi.org/10.1007/s12041-022-01417-3>]
- JAKOBSSON, A., WESTERBERG, R., JACOBSSON, A. (2006) Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research* vol. 45, n° 3, p. 237-249. [<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004>]
- JENSEN, R.G. (1999) Lipids in human milk. *Lipids* vol. 34, n° 12, p. 1243-1271. [<https://doi.org/10.1007/s11745-999-0477-2>]
- JIRKOF, P. (2014) Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of Neuroscience Methods* vol. 234, p. 139-146. [<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001>]
- JUNGBLUTH, H., WALLGREN-PETTERSSON, C., LAPORTE, J. (2008) Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet Journal of Rare Diseases* vol. 3, p. 26. [<https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-26>]
- JUNGBLUTH, H., ZHOU, H., SEWRY, C.A., *et al.* (2007) Centronuclear myopathy due to a de novo dominant mutation in the skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) gene. *Neuromuscular disorders: NMD* vol. 17, n° 4, p. 338-345. [<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2007.01.016>]
- KIHARA, A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *Journal of Biochemistry* vol. 152, n° 5, p. 387-395. [<https://doi.org/10.1093/jb/mvs105>]
- KIM, J., BAGCHI, I.C., BAGCHI, M.K. (2009) Control of ovulation in mice by progesterone receptor-regulated gene networks. *Molecular Human Reproduction* vol. 15, n° 12, p. 821-828. [<https://doi.org/10.1093/molehr/gap082>]
- KOPROWSKI, J. (1992) Removal of Copulatory Plugs by Female Tree Squirrels. *Journal of Mammalogy* vol. 73, p. 572. [<https://doi.org/10.2307/1382026>]
- KRAMER, J.W., HEGREBERG, G.A., BRYAN, G.M., *et al.* (1976) A muscle disorder of Labrador retrievers characterized by deficiency of type II muscle fibers. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 169, n° 8, p. 817-820.
- KRAMER, J.W., HEGREBERG, G.A., HAMILTON, M.J. (1981) Inheritance of a neuromuscular disorder of Labrador retriever dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 179, n° 4, p. 380-381.
- LANE-PETTER, W. (1968) Cannibalism in rats and mice. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* vol. 61, n° 12, p. 1295-1296.
- LE GRAND, F., RUDNICKI, M.A. (2007) Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 19, n° 6, p. 628-633. [<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.09.012>]

- MAURER, M., MARY, J., GUILLAUD, L., *et al.* (2012) Centronuclear Myopathy in Labrador Retrievers: A Recent Founder Mutation in the PTPLA Gene Has Rapidly Disseminated Worldwide. *PLOS ONE* vol. 7, n° 10, p. e46408. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046408]
- MCKERRELL, R.E., BRAUND, K.G. (1987) Hereditary myopathy in Labrador Retrievers: clinical variations. *Journal of Small Animal Practice* vol. 28, n° 6, p. 479-489. [https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1987.tb01441.x]
- MIDA, K., SHAMAY, A., ARGOV-ARGAMAN, N. (2012) Elongation and desaturation pathways in mammary gland epithelial cells are associated with modulation of fat and membrane composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 60, n° 42, p. 10657-10665. [https://doi.org/10.1021/jf302757j]
- MILLAY, D.P., O'ROURKE, J.R., SUTHERLAND, L.B., *et al.* (2013) Myomaker: A membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* vol. 499, n° 7458, p. 301-305. [https://doi.org/10.1038/nature12343]
- MOLINO, D., VAN DER GIESSEN, E., GISSOT, L., *et al.* (2014) Inhibition of very long acyl chain sphingolipid synthesis modifies membrane dynamics during plant cytokinesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* vol. 1841, n° 10, p. 1422-1430. [https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.06.014]
- MONNIAUX, D., CARATY, A., CLEMENT, F., *et al.* (2009) Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRAE Productions Animales* vol. 22, n° 2, p. 59-76. [https://doi.org/10.20870/productions-animales.2009.22.2.3335]
- MOORE, M.P., REED, S.M., HEGREBERG, G.A., *et al.* (1987) Electromyographic evaluation of adult Labrador retrievers with type-II muscle fiber deficiency. *American Journal of Veterinary Research* vol. 48, n° 9, p. 1332-1336.
- MORALES, E., BUSTAMANTE, M., GONZALEZ, J.R., *et al.* (2011) Genetic Variants of the FADS Gene Cluster and ELOVL Gene Family, Colostrums LC-PUFA Levels, Breastfeeding, and Child Cognition. *PLOS ONE* vol. 6, n° 2, p. e17181. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017181]
- MOSIG, D.W., DEWSBURY, D.A. (1976) Studies of the copulatory behavior of house mice (*Mus musculus*). *Behavioral Biology* vol. 16, n° 4, p. 463-473. [https://doi.org/10.1016/S0091-6773(76)91635-7]
- MUHAMMAD, E., REISH, O., OHNO, Y., *et al.* (2013) Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Human Molecular Genetics* vol. 22, n° 25, p. 5229-5236. [https://doi.org/10.1093/hmg/ddt380]
- MUKUND, K., SUBRAMANIAM, S. (2020) Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* vol. 12, n° 1, p. e1462. [https://doi.org/10.1002/wsbm.1462]
- OHNO, Y., SUTO, S., YAMANAKA, M., *et al.* (2010) ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 107, n° 43, p. 18439-18444. [https://doi.org/10.1073/pnas.1005572107]
- PARADIES, G., PARADIES, V., DE BENEDICTIS, V., *et al.* (2014) Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Dynamic and ultrastructure of bioenergetic membranes and their components vol. 1837, n° 4, p. 408-417. [https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.006]
- PARKER, G.A., PIZZARI, T. (2010) Sperm competition and ejaculate economics. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* vol. 85, n° 4, p. 897-934. [https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00140.x]
- PAUTER, A.M., OLSSON, P., ASADI, A., *et al.* (2014) Elovl2 ablation demonstrates that systemic DHA is endogenously produced and is essential for lipid homeostasis in mice. *Journal of Lipid Research* vol. 55, n° 4, p. 718-728. [https://doi.org/10.1194/jlr.M046151]
- PELÉ, M., TIRET, L., KESSLER, J.-L., *et al.* (2005) SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Human Molecular Genetics* vol. 14, n° 11, p. 1417-1427. [https://doi.org/10.1093/hmg/ddi151]
- PERDREAU-DAHL, H., LIPSETT, D.B., FRISK, M., *et al.* (2023) BIN1, Myotubularin, and Dynamin-2 Coordinate T-Tubule Growth in Cardiomyocytes. *Circulation Research* vol. 132, n° 11, p. e188-e205. [https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.122.321732]
- PERNAS, L., SCORRANO, L. (2016) Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annual Review of Physiology* vol. 78, n° 1, p. 505-531. [https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105011]
- POSSE DE CHAVES, E., SIPIONE, S. (2010) Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Letters* vol. 584, n° 9, p. 1748-1759. [https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.010]
- PROLA, A., BLONDELLE, J., VANDESTIENNE, A., *et al.* (2021) Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle. *Science Advances* vol. 7, n° 1, p. eabd6322. [https://doi.org/10.1126/sciadv.abd6322]

- RAMM, S.A., PARKER, G.A., STOCKLEY, P. (2005) Sperm competition and the evolution of male reproductive anatomy in rodents. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 272, n° 1566, p. 949-955. [<https://doi.org/10.1098/rspb.2004.3048>]
- RELAIX, F., MONTARRAS, D., ZAFFRAN, S., *et al.* (2006) Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *The Journal of Cell Biology* vol. 172, n° 1, p. 91-102. [<https://doi.org/10.1083/jcb.200508044>]
- ROME, L.C., FUNKE, R.P., ALEXANDER, R.M., *et al.* (1988) Why animals have different muscle fibre types. *Nature* vol. 335, n° 6193, p. 824-827. [<https://doi.org/10.1038/335824a0>]
- SAMPATH, Srihari C., SAMPATH, Srinath C., MILLAY, D.P. (2018) Myoblast fusion confusion: the resolution begins. *Skeletal Muscle* vol. 8, n° 1, p. 3. [<https://doi.org/10.1186/s13395-017-0149-3>]
- SCHLAME, M., HORVÁTH, L., VÍGH, L. (1990) Relationship between lipid saturation and lipid-protein interaction in liver mitochondria modified by catalytic hydrogenation with reference to cardiolipin molecular species. *Biochemical Journal* vol. 265, n° 1, p. 79-85.
- SILVERMAN, J., STONE, D.W., POWERS, J.D. (1992) The lipid composition of milk from mice fed high or low fat diets. *Laboratory Animals* vol. 26, n° 2, p. 127-131. [<https://doi.org/10.1258/002367792780745832>]
- SMITH, S. (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* vol. 8, n° 15, p. 1248-1259.
- SUTTER, A., SIMMONS, L.W., LINDHOLM, A.K., *et al.* (2016) Function of copulatory plugs in house mice: mating behavior and paternity outcomes of rival males. *Behavioral Ecology* vol. 27, n° 1, p. 185-195. [<https://doi.org/10.1093/beheco/arv138>]
- TACKOEN, M. (2012) [Breast milk: its nutritional composition and functional properties]. *Revue Medicale De Bruxelles* vol. 33, n° 4, p. 309-317.
- TIRET, L., BLOT, S., KESSLER, J.-L., *et al.* (2003) The *cnm* locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2. *Human Genetics* vol. 113, n° 4, p. 297-306. [<https://doi.org/10.1007/s00439-003-0984-7>]
- TOSCANO, A., EMMANUELE, V., SAVARESE, M., *et al.* (2017) Pseudo-dominant inheritance of a novel homozygous *HACD1* mutation associated with congenital myopathy: The first caucasian family. *Neuromuscular Disorders* vol. 27, p. S173. [<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.06.290>]
- TSENG, Y.-H., CYPESS, A.M., KAHN, C.R. (2010) Cellular Bioenergetics as a Target for Obesity Therapy. *Nature reviews. Drug discovery* vol. 9, n° 6, p. 465-482. [<https://doi.org/10.1038/nrd3138>]
- VANDESTIENNE-RATNAM, A. (2021) Décryptage du rôle du gène *Hacd1* dans le fonctionnement mitochondrial et musculaire. phdthesis. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12.
- VOSS, R.C. (1979) Male accessory glands and the evolution of copulatory plugs in rodents. *OCCASIONAL PAPERS OF THE MUSEUM OF ZOOLOGY UNIVERSITY OF MICHIGAN* n° 689, p. 27.
- WANG, W., JOSE, C., KENNEY, N., *et al.* (2009) Global expression profiling reveals regulation of CTGF/CCN2 during lactogenic differentiation. *Journal of Cell Communication and Signaling* vol. 3, n° 1, p. 43-55. [<https://doi.org/10.1007/s12079-009-0047-5>]
- WANG, Y., BOTOLIN, D., CHRISTIAN, B., *et al.* (2005) Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *Journal of Lipid Research* vol. 46, n° 4, p. 706-715. [<https://doi.org/10.1194/jlr.M400335-JLR200>]
- WANG, Z., WANG, D.H., GOYKHMANN, Y., *et al.* (2019) The elongation of very long-chain fatty acid 6 gene product catalyses elongation of n-13 : 0 and n-15 : 0 odd-chain SFA in human cells. *The British Journal of Nutrition* vol. 121, n° 3, p. 241-248. [<https://doi.org/10.1017/S0007114518003185>]
- ZADRAVEC, D., TVRDIK, P., GUILLOU, H., *et al.* (2011) *ELOVL2* controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice. *Journal of Lipid Research* vol. 52, n° 2, p. 245-255. [<https://doi.org/10.1194/jlr.M011346>]
- ZHANG, J.Y., KOTHAPALLI, K.S.D., BRENNAN, J.T. (2016) Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* vol. 19, n° 2, p. 103-110. [<https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000254>]
- ZHAO, M., MAANI, N., DOWLING, J.J. (2018) Dynamin 2 (DNM2) as Cause of, and Modifier for, Human Neuromuscular Disease. *Neurotherapeutics* vol. 15, n° 4, p. 966-975. [<https://doi.org/10.1007/s13311-018-00686-0>]
-

Annexe 1 : Suivi du poids des souriceaux

Les cases colorés en jaune sont les jours où le poids des souriceaux stagne. les souriceaux avec un suivi de poids qui s'arrête entre le jour 9 et le jour 11 sont les souriceaux mis à mort.

ID mère	sexe	Génotype	Groupe	masse J+4	masse J+5	masse J+6	masse J+7	masse J+8	masse J+9	masse J+10	masse J+11	masse J+12	masse J+13	masse J+14	masse J+15	masse J+16	masse J+17	masse J+18	
F6-643-670 (-/-)	1 F	+/+	1	2,96	3,35	3,79	4,2	4,62	4,98	5,49	5,6	6	6,41	6,7	7,01	7,28	7,38	7,67	
	2 F	+/+		2,81	2,49	3,15	4,04	4,38	4,69	5,17	5,2	5,64	5,94	6,33	6,48	6,68	6,89	7,17	
	3 F	+/+		2,31	2,73	2,81	3,09	3,39	3,64	4	4,2	4,48	4,82	5,14	5,41	5,56	5,67	5,95	
	4 M	+/+		2,63	2,9	3,36	3,76	4,04	4,4	4,98									
	5 F	+/+		2,48	3,18	3,55	3,53	3,91	4,3	4,73	4,8	4,14	5,45	5,85	6,09	6,31	6,45	6,69	
F5-615-680 (-/-)	1 F	+/+	1	2,71	3,32	3,68	4,08	4,55	5,07	5,5	5,86	6,3	6,59	6,82	7,06	7,14	7,45	7,74	
	2 F	+/+		2,8	3,21	3,58	3,94	4,19	4,66										
	3 F	+/+		2,83	3,37	3,71	4,1	4,49	4,76	5,2	5,54	5,9	6,16	6,26	6,6	6,71	7,04	7,53	
	4 M	+/+		2,86	3,29	3,77	4,08	4,45	4,84	5,33	5,52	5,86	6,11	6,28	6,56	6,66	6,87	7,37	
	5 F	+/+		2,65	3,11	3,53	3,83	4,19	4,48	4,84	5,06	5,31	5,67	5,9	6,04	6,16	6,4	6,63	
	6 M	+/+		2,64	3,11	3,58	3,78	4,16	4,41	4,78	5,02	5,37	5,57	5,89	6,11	6,17	6,22	6,46	
	7 M	+/+		2,85	3,34	3,69	4,11	4,38	4,55	4,8	5,2	5,52	5,76	5,89	6,13	6,17	6,33	6,7	
F5-195-227 (-/-)	1 M	+/+	1	2,56	2,89	3,29	3,62	4,04	4,28	4,65	4,9	5,14	5,51	5,79	5,98	6,14	6,15	6,12	
	2 F	+/+		2,91	3,23	3,72	4,06	4,42	4,65	5,11	5,38	5,81	6,02	6,35	6,6	6,84	6,89	7,15	
	3 M	+/+		2,46	2,91	3,25	3,59	4	4,29	4,8	4,97	5,17	5,48	5,73	5,84	5,99	6,11	6,3	
	4 M	+/+		2,61	3,06	3,3	3,71	4,16	4,38	4,78									
	5 F	+/+		2,69	2,82	3,52	3,91	4,33	4,67	5,04	5,3	5,64	5,8	6,07	6,33	6,47	6,34	6,55	
	6 M	+/+		2,62	3,01	3,37	3,69	4,12	4,31	4,61	4,85	5,2	5,58	5,7	5,98	6,05	6,01	6,11	
F6-643-673 (-/-)	1 F	+/+	1	3,46	3,94	4,52	4,81	5,17	5,4	5,68	5,79	5,58	5,63	5,75	5,67	5,8	6,59	7,25	
	2 M	+/+		2,75	3,27	3,67	4,51	4,49	4,63										
	3 M	+/+		3,21	3,64	4,1	4,1	4,85	5,2	5,3	5,3	5,3	5,38	5,69	5,73	6,23	6,4	7,34	
F5-196-237 (-/-)	1 M	+/+	1	2,62	3,11	3,55	3,91	4,14	4,43	4,69	4,98	5,28	5,47	5,52	5,63	5,6	5,58	5,57	
	2 F	+/+		2,66	3,25	3,54	3,98	4,29	4,72	5,01	5,42	5,75	6,05	6,32	6,57	6,6	6,66	6,89	
	3 M	+/+		2,33	2,74	3,07	3,29	3,5	3,81	5,11									
	4 M	+/+		2,37	2,97	4,34	4,79	5,29	5,97	6,17	6,65	7,02	7,32	7,65	7,64	7,8	8,18	8,89	
	5 F	+/+		2,56	3,06	3,42	3,59	3,93	4,37	4,66	5,15	5,32	5,64	5,91	6,13	6,2	6,28	6,34	
	6 F	+/+		2,99	3,52	3,86	4,26	4,63	5,1	5,37	5,73	6,17	6,44	6,55	6,8	7	7,22	7,99	
	7 M	+/+		2,55	3,07	3,43	3,77	4,3	4,58	4,83	5,08	5,39	5,66	5,79	6,01	6,1	6,19	6,29	
	8 M	+/+		3,1	3,59	3,95	4,37	4,94	5,18	5,55	5,96	6,34	6,59	6,74	6,89	7	7,22	8,05	
	9 F	+/+		2,78	3,21	3,67	3,89	4,26	4,64	4,92	6,3	5,66	5,91	6,32	6,41	6,4	6,72	7	
F6-643-670 (-/-)	1 F	+/+	1	8,41	9,22	9,65	10,08	11,22	12,24	12,49	13,38	14,1	15,01						
	2 F	+/+		7,86	8,53	8,96	9,61	10,61	11,54	12,16	12,73	13,4	14						
	3 F	+/+		6,45	6,89	7,32	7,79	8,79	9,61	10,25	10,6	11,2	11,87						
	4 M	+/+																	
	5 F	+/+		7,09	7,47	7,8	8,38	9,14	9,86	10,58	10,96	11,2	11,77						
F5-615-680 (-/-)	1 F	+/+	1	8,18	8,89	9,42	10,47	11,36	11,93	12,1	13,04	14,15	15,82						
	2 F	+/+																	
	3 F	+/+		7,82	8,61	9,39	9,72	10,55	12,18	12,3	13,33	14,29	14						
	4 M	+/+		7,74	7,97	8,85	10,47	11,35	11,53	12,1	13,27	14,55	14,45						
	5 F	+/+		7,17	7,43	8,09	9,28	10,04	10,95	11,2	12,36	13,51	13,32						
	6 M	+/+		7,06	7,58	7,99	9,09	9,82	10,55	10,6	11,5	12,37	12,27						
	7 M	+/+		7,29	7,69	8,45	9,64	10,4	11,09	11,6	12,85	14,11	13,91						
F5-195-227 (-/-)	1 M	+/+	1	6,58	7,77	8,41	9,32	10,4	11,28	12,34	12,88	13,7	15,05						
	2 F	+/+		7,68	8,52	9,44	10,17	11,1	12	12,81	13,3	13,5	14,58						
	3 M	+/+		6,63	7,65	8,47	9,24	10,12	11,1	11,6	12,38	13,1	14,11						
	4 M	+/+																	
	5 F	+/+		7,1	8,48	9,11	10,02	11,16	12,05	12,76	13,45	14	15,05						
	6 M	+/+		6,57	7,7	8,16	8,75	9,98	10,93	11,95	12,57	13,7	15,03						
F6-643-673 (-/-)	1 F	+/+	1	7,95	8,63	9,35	10,13	10,89	11,69	12,1	13,07	14,28	14,57						
	2 M	+/+																	
	3 M	+/+		7,87	8,62	9,53	10,52	11,6	12,49	13,4	14,24	15,54	16,1						
F5-196-237 (-/-)	1 M	+/+	1	5,95	6,36	7,19	7,9	8,5	9,6	10,5	11	12	13,2						
	2 F	+/+		7,4	7,97	9,15	9,8	10,7	11,5	12,4	13	13,7	14,4						
	3 M	+/+																	
	4 M	+/+		9,43	9,93	10,66	11,1	12	12,6	14	14,2	15,5	16,5						
	5 F	+/+		6,51	7,73	8,1	8,7	9,2	10	10,8	11	12,1	13,3						
	6 F	+/+		8,44	9,14	9,96	10,7	11,3	12,2	13,3	13,7	14,2	14,9						
	7 M	+/+		7,07	7,63	8,17	8,7	9,7	10,7	11,8	12,3	13,3	14,4						
	8 M	+/+		8,5	9,05	9,8	10,3	11	12	13,1	13,6	14,5	15,7						
	9 F	+/+		7,04	8,05	8,94	9,6	10,4	11	12,1	12,5	13,2	13,7						

Annexe 1 - suite

ID mère	sexe	Génotype	Groupe	masse J+4	masse J+5	masse J+6	masse J+7	masse J+8	masse J+9	masse J+10	masse J+11	masse J+12	masse J+13	masse J+14	masse J+15	masse J+16	masse J+17	masse J+18	
F5-195-226 (+/+)	1 M	+/-	2	2,94	3,35	3,77	4,27	4,7	5,02	5,57	6,01	6,53	6,91	7,05	7,55	7,59	7,51	7,94	
	2 F	+/-		2,97	3,28	3,67	4,04	4,53	5,01	5,51	5,85	6,28	6,56	6,99	7,13	7,17	7,01	7,41	
	3 M	+/-		2,87	3,22	3,67	4,16	4,48	4,87	5,39	5,75	6,11	6,32	6,64	6,87	7,06	6,99	7,31	
	4 F	+/-		2,63	3,05	3,62	4,03	4,38	4,62	5,08	5,5	6,28	6,63	6,99	7,27	7,31	7,29	7,62	
	5 F	+/-		2,76	3,18	3,74	4,25	4,56	4,96	5,5									
	6 M	+/-		2,64	3,21	3,71	4,12	4,61	5,06	5,48	5,87	6,08	6,59	6,79	6,97	7,14	7,16	7,23	
N°1																			
F5-201-248 (+/+)	1 M	+/-	2	3,01	3,49	4,13	4,53	4,98	5,44	5,92	6,19	6,77	7,05	7,45	7,48	7,51	7,85	8,45	
	2 F	+/-		2,5	3,09	3,52	4,04	4,42	4,82										
	3 M	+/-		2,81	3,25	3,81	4,24	4,62	4,99	5,36	5,72	6,1	6,45	6,55	7,04	7,11	7,32	7,59	
	4 M	+/-		2,74	3,04	3,5	3,8	4,23	4,67	4,98	5,39	5,76	6,07	6,21	6,41	6,41	6,6	6,81	
	5 F	+/-		2,65	3,23	3,66	4,09	4,46	4,94	5,33	5,72	6,16	6,41	6,63	6,7	6,74	6,92	7,01	
	6 M	+/-		2,6	3,06	3,6	4,14	4,42	4,88	5,21	5,63	6,05	6,45	6,12	7,02	7,02	7,12	7,53	
	7 M	+/-		2,69	3,09	3,53	4,12	4,43	4,83	5,2	5,69	5,98	6,38	6,86	7,12	7,15	7,31	7,42	
F6-633-659 (+/+)	1 M	+/-	2	2,87	3,2	3,61	3,88	4,43	4,73	5,01	5,33	5,62	6,01	6,16	6,25	6,75	7,33	7,86	
	2 F	+/-		2,57	2,86	3,23	3,64	3,98	4,28	4,64	5,06	5,24	5,42	5,5	5,73	6,02	6,36	6,83	
	3 F	+/-		2,78	3,12	3,45	4,01	4,35	4,69										
	4 F	+/-		2,79	3,02	3,41	3,92	4,24	4,71	5,26	5,59	5,83	6,07	6,26	6,39	6,6	7,1	7,61	
	5 M	+/-		3,03	3,14	3,62	3,85	4,29	4,62	4,96	5,35	5,6	5,79	5,92	6,12	6,23	6,27	7,24	
	6 M	+/-		2,83	2,99	3,47	3,89	4,25	4,53	4,83	5,12	5,5	5,86	6,01	6,23	6,46	7,03	7,7	
	7 M	+/-		2,58	2,84	3,15	3,54	3,94	4,21	4,53	4,91	5,18	5,61	5,68	5,9	6,05	7,28	6,79	
	8 F	+/-		3,03	3,35	3,78	4,17	4,55	4,98	5,35	5,81	6,01	6,24	6,51	6,74	6,96	7,52	8,11	
F5-201-246 (+/+)	1 F	+/-	2	3,01	3,71	4,13	4,62	4,96	5,3	5,67	6,17	6,57	6,92	6,94	7,06	7,13	7,26	7,8	
	2 M	+/-		3,35	3,91	4,44	4,82	5,23	5,63	6,15	6,51	6,8	7,11	7,33	7,43	7,45	7,58	8,2	
	3 F	+/-		3,33	3,78	4,25	4,75	5,13	5,63	5,95	6,39	6,71	6,99	7,18	7,26	7,34	7,65	8,1	
	4 M	+/-		3,16	3,71	4,09	4,4	4,89	5,28	5,68	6,14	6,41	6,79	6,97	7,1	7,1	7,35	7,8	
	5 F	+/-		3,14	3,69	4,23	4,6	4,97	5,4	5,87	6,24	6,64	7,03	7,25	7,4	7,4	7,58	8,1	
	6 F	+/-		3,29	3,8	4,25	4,68	5,07	5,57										
	7 M	+/-		2,84	3,29	3,7	4,05	4,44	4,93	5,22	5,62	6,05	6,3	6,53	6,62	6,62	6,5	6,8	
N°17																			
174 (+/+)	1 F	+/-	2	2,83	3,45	4	4,7	5,3	5,4	5,3	5,1	4,9	4,8	4,7	5,1	5,6	5,9	6,2	
	2 M	+/-		2,73	3,31	3,7	4,5	5,1	5,3	5,3	5,2	5,1	5,1	5,3	5,6	5,7	6,7	6,9	
	3 M	+/-		2,84	3,43	3,9	4,6	4,9	5	5	4,7	4,6	4,8	5	4,9	5,5	6	6,2	
F5-195-226 (+/+)	1 M	+/-	2	8,7	9,87	10,75	11,3	11,79	12,92	14,02	15,4	15,1	16,58						
	2 F	+/-		8,26	9,67	10,19	11,28	11,8	12,74	13,61	14,08	14,1	15,04						
	3 M	+/-		8,51	9,68	10,22	11,42	12,05	12,77	13,82	14,83	15,3	16,19						
	4 F	+/-		8,3	9,47	10,28	11,16	11,52	12,01	12,71	13,57	13,4	14,3						
	5 F	+/-																	
	6 M	+/-		7,91	8,92	9,58	10,56	11,14	11,9	12,78	13,94	14,4	15,38						
F5-201-248 (+/+)	1 M	+/-	2	9,02	9,8	10,72	11,57	12,41	12,96	14,15	14,7	15,77	16,76						
	2 F	+/-																	
	3 M	+/-		8,02	8,98	9,91	10,88	11,74	12,72	13,92	14,5	15,59	17,13						
	4 M	+/-		7,65	8,29	9,75	10,05	10,91	11,56	12,93	13,4	14,34	15,33						
	5 F	+/-		7,75	8,44	9,01	10,53	11,2	11,79	12,55	12,8	13,75	14,99						
	6 M	+/-		8,01	8,67	9,64	10,19	11,05	11,9	12,8	13,5	14,46	15,85						
	7 M	+/-		7,98	8,69	9,66	10,58	11,13	11,94	13,12	13,7	14,72	17,79						
F6-633-659 (+/+)	1 M	+/-	2	8,7	9,52	10,1	10,44	12,27	12,54	14,06	14,79	15,5	16,4						
	2 F	+/-		7,65	8,11	8,6	9,44	10,31	10,58	11,28	11,78	12,6	13						
	3 F	+/-																	
	4 F	+/-		8	8,93	9,5	10,36	11,39	11,8	12,78	13,15	13,5	14,2						
	5 M	+/-		8,09	8,82	9,4	10,36	11,25	11,68	12,8	15,68	13,4	15,2						
	6 M	+/-		8,45	9,23	9,9	10,58	12,02	11,74	13,9	15,22	15,9	16,5						
	7 M	+/-		7,17	8,02	8,7	9,19	10,21	11,17	12,08	12,81	13,7	14,4						
	8 F	+/-		8,39	9,27	10	10,69	11,73	12,11	13,19	13,68	14,6	15,1						
F5-201-246 (+/+)	1 F	+/-	2	8,88	9,88	10,59	11,63	12,31	13,3	14,4	15	16,4	17,1						
	2 M	+/-		9,24	10,18	10,87	11,83	12,93	14,1	15,2	16,2	17,5	18,1						
	3 F	+/-		9,36	10,16	10,8	11,56	12,26	12,9	13,7	14,2	15,4	15,6						
	4 M	+/-		9,08	9,78	10,36	11,62	12,64	13,7	14,8	15,8	16,8	17,4						
	5 F	+/-		9,46	10,1	10,94	11,59	11,96	12,7	13,4	13,9	14,5	15						
	6 F	+/-																	
	7 M	+/-		7,42	8,08	8,85	9,71	10,63	11,8	12,5	13,8	15	15,8						
N°17																			
174 (+/+)	1 F	+/-	2	6,7	7,5	8,4	9,33	9,6	10,6	11,2	11,8	12,4	13,1						
	2 M	+/-		6,7	8,2	9,4	10,15	10,4	11,6	12,9	13,4	14,1	15,1						
	3 M	+/-		7,5	7,8	8,1	8,84	9,4	10,3	11,5	12	12,8	14						

Annexe 1 - Fin

ID mère	sexe	Génotype	Groupe	masse J+4	masse J+5	masse J+6	masse J+7	masse J+8	masse J+9	masse J+10	masse J+11	masse J+12	masse J+13	masse J+14	masse J+15	masse J+16	masse J+17	masse J+18
145 (+/+)	1	M	+/+	2,84	3,32	3,78	4,23	4,55	4,89	5,37	5,71	6,04	6,39	6,8	6,91	7,07	7,17	7,59
	2	M	+/+	3,03	3,46	3,92	4,41	4,75	5,05	4,56	5,93	6,37	6,55	7	7,2	7,35	7,55	7,13
	3	M	+/+	2,7	3,19	3,6	4,16	4,51	4,87	5,22	5,59	5,93	6,25	6,5	6,7	6,85	7,13	7,68
	4	M	+/+	3,1	3,57	4,02	4,53	4,95	5,4	5,81	6,14	6,46	6,86	7,2	7,41	7,54	7,82	8,31
	5	M	+/+	2,86	3,26	3,68	4,27	4,66	5,05	5,55	5,87	6,19	6,48	6,8	6,97	7,13	7,28	7,77
	6	F	+/+	2,88	3,27	3,74	4,33	4,1	4,53	5,01	5,36	5,39	6,12	6,5	6,89	6,94	6,96	7,39
	7	F	+/+	2,35	2,83446	3,32	3,83	4,1	4,53	5,01	5,36	5,39	6,12	6,5	6,89	6,94	6,96	7,39
	8	F	+/+	3,02		3,83	4,44	4,83	5,31	5,7	6,22	6,52	6,88	7,3	7,5	7,64	7,9	8,42
170 (+/+)	1	F	+/+	2,4	2,9	3,45	4,1	4,5	5	5,7	6,3	6,8	7	7,6	7,8	7,9	7,9	8,3
	2	M	+/+	2,5	2,93	3,5	4	4,5	5,1	5,8	6,1	6,6	7	7,7	7,9	8,1	8	8,5
	3	M	+/+	2,26	2,7	3,16	3,7	4,1	4,5	5,2	5,7	6	6,4	7,1	7,3	7,5	7,6	7,6
	4	M	+/+	2,38	2,9	3,34	3,8	4,3	4,78	5,6	5,9	6,2	6,6	7,1	7,4	7,5	7,7	7,8
	5	M	+/+	2,19	2,47	2,9	3,2	3,3	3,2	3,2	2,7							
	6	M	+/+	2,5	3,05	3,67	4,2	4,8	5,35	6	6,4	6,8	7,2	7,8	8,4	8,3	8,4	8,9
	7	M	+/+	2,5	3,04	3,4	3,9	4,4	4,75									
	8	M	+/+	2,5	3,04	3,4	3,9	4,4	4,75									
171 (+/+)	1	M	+/+	2,37	3,04	3,46	3,79	4,17	4,51									
	2	M	+/+	2,27	2,85	3,38	3,69	4,16	4,28	4,76	5	5,3	5,6	5,7	6	6,1	6,5	6,8
	3	M	+/+	2,5	3,08	3,43	3,79	4,11	4,49	5,1	5,14	5,7	6,2	6,3	6,5	6,6	7	7,3
	4	M	+/+	2,65	3,23	3,72	4,06	4,52	4,67	5,26	5,6	5,9	6,2	6,6	6,7	6,9	7,3	7,6
	5	F	+/+	2,68	3,25	3,7	4,05	4,31	4,7	5,26	5,6	6	6,3	6,5	6,8	6,8	7,1	7,4
	6	F	+/+	2,09	2,96	3,47	3,76	4,08	4,56	5,04	5,4	5,6	5,9	6,2	6,3	6,5	6,8	7,3
	7	F	+/+	2,51	3,12	3,47	3,83	4,3	4,63	5,16	5,5	5,8	6,2	6,5	6,7	6,8	6,5	7,1
	8	M	+/+	2,53	3,09	3,64	3,85	4,2	4,46	5,04	5,3	5,7	6	6,2	6,4	6,6	6,5	7,1
144 (+/+)	1	F	+/+	3,37	3,85	4,1	4,4	4,62	4,97	5,3	5,66	5,85	6,02	6,16	6,35	7	7,6	8,38
	2	M	+/+	3,32	3,68	4,05	4,43	4,56	5,6	5,35								
	3	M	+/+	3,56	3,82	4,19	4,53	4,89	5,24	5,57	5,94	6,31	6,95	6,51	6,68	7,38	7,88	8,76
	4	M	+/+	3,5	3,93	4,3	4,71	5,06	5,3	5,57	5,91	6,28	6,41	6,51	6,74	7,4	7,88	8,44
	5	F	+/+	3,35	3,63	4,12	4,35	4,84	5,17	5,44	5,71	5,91	6,1	6,2	6,39	6,62	7,38	7,97
	6	M	+/+	3,27	3,67	3,86	4,14	4,55	4,89	5,2	5,52	5,89	5,96	6,07	6,22	6,59	7,91	8,04
	7	F	+/+	3,26	3,53	3,92	4,3	4,64	4,99	5,33	5,58	5,93	5,98	6,08	5,93	6,32	6,96	7,71
	8	F	+/+	3,09	3,38	3,85	4,18	4,45	4,7	5,08	5,28	5,43	5,58	5,59	5,8	6,22	6,67	7,42
	9	F	+/+	3,33	3,63	4,04	4,47	4,75	5,12	5,39	5,74	5,95	6,18	6,33	6,55	7,02	7,45	8,03
143 (+/+)	1	F	+/+	3,18	3,57	4,02	4,61	4,92	5,21	5,67	6,03	6,44	6,75	6,91	7,11	7,24	7,82	8,65
	2	M	+/+	3,4	3,76	4,17	4,7	4,94	5,28	5,55								
	3	M	+/+	3,41	3,91	4,31	4,8	5,04	5,44	5,82	6,28	6,54	6,83	7,1	7,22	7,46	7,96	8,68
	4	F	+/+	3,38	3,83	4,24	4,74	5,01	5,42	5,72	6,11	6,32	6,58	6,8	7,26	7,17	7,73	8,54
	5	F	+/+	3,18	3,58	4,13	4,58	4,79	5,2	5,59	5,94	6,41	6,7	6,93	7,17	7,25	7,68	8,42
	6	F	+/+	3,23	3,67	4,05	4,54	4,69	5,26	5,5	5,9	6,27	6,47	6,71	6,84	7,01	7,47	8,25
	7	F	+/+	3,18	3,55	4,03	4,43	4,81	5,2	5,33	5,86	6,28	6,53	6,67	6,91	6,97	7,55	8,24
145 (+/+)	1	M	+/+	8,05	9	9,6	10,3	11,2	11,9	13	13,9	15	16,1					
	2	M	+/+	8,78	9,7	10,6	11,4	12,8	14	15	16,5	17,5	18,1					
	3	M	+/+	7,91	8,6	9,7	10,5	11,3	12,1	12,7	13,9	14,8	16					
	4	M	+/+	8,9	10	10,3	11,5	11,9	13	14	15	16	17,1					
	5	M	+/+	8,04	8,7	9,7	9,4	10,4	11,2	11,8	12,4	13,6	14,1					
	6	F	+/+															
	7	F	+/+	7,99	8,6	9,6	10,4	11,5	12	12,3	13,3	14,2	15,2					
	8	F	+/+	8,74	9,9	10,3	11,3	12,5	13,2	13,5	14,2	15,1	15,8					
170 (+/+)	1	F	+/+	8,8	9,4	10,49	11,11	12,13	12,58	13,2	14,2	14,98	15,96					
	2	M	+/+	9	9,9	10,75	11,7	12,83	13,42	14,4	15,7	16,73	17,68					
	3	M	+/+	7,7	8,4	9,5	10,23	11,32	12,03	13,2	14,1	15,52	16,1					
	4	M	+/+	8,3	8,9	9,94	10,75	11,64	12,33	13,1	14,1	15,4	15,5					
	5	M	+/+															
	6	M	+/+	9	10,1	11,08	11,98	12,84	13,25	14,2	15,1	16,54	17,3					
	7	M	+/+															
171 (+/+)	1	M	+/+															
	2	M	+/+	7,3	8,1	8,9	9,6	10,6	11,4	12,3	13,2	14,5	15,3					
	3	M	+/+	8	8,7	9,4	10,2	11,5	12,3	12,9	13,8	15,2	16,3					
	4	M	+/+	8	8,8	10	10,7	12	12,8	13,5	14,2	15,7	17					
	5	F	+/+	7,6	8,4	9,7	10,3	11,6	12,4	12,7	13,5	14,4	15,3					
	6	F	+/+	7,3	8	9,1	9,6	10,9	11,5	12,1	12,5	13,4	14,2					
	7	F	+/+	8,1	8,9	9,7	10,4	11	11,4	12,5	13,3	14	14,8					
	8	M	+/+	8	8,7	9,8	10,5	10,9	11,9	13	13,8	15,1	15,7					
144 (+/+)	1	F	+/+	9,22	10	10,91	11,5	12,29	13,4	13	13,97	14,36	14,8					
	2	M	+/+															
	3	M	+/+	9,77	10,51	11,92	12	13,23	14,15	14,23	15,05	15,06	16,9					
	4	M	+/+	9,14	9,84	11,43	11,9	12,79	14,04	14,3	15,22	16,19	16,88					
	5	F	+/+	8,86	9,55	10,28	10,9	11,93	12,66	12,87	12,88	13,4	13,85					
	6	M	+/+	8,95	9,66	10,59	11,1	12,04	13,49	13,32	14,22	15,19	15,96					
	7	F	+/+	8,47	9,35	10,16	10,7	11,73	12,59	12,69	13,47	13,66	14,24					
	8	F	+/+	7,98	9,05	9,75	9,9	10,82	11,33	11,53	11,9	12,27	12,66					
	9	F	+/+	8,94	9,43	10,4	10,7	11,37	12,47	12,71	12,9	13,3	13,7					
143 (+/+)	1	F	+/+	9,69	10,04	11,02	11,04	11,58	13,2	13,24	13,81	14,43	14,6					
	2	M	+/+															
	3	M	+/+	9,7	10,52	11,53	12,2	13,13	14,49	14,93	16,2	16,97	17,6					
	4	F	+/+	9,58	10,18	11,3	11,4	12,19	13,24	13,17	13,5	13,64	14,1					
	5	F	+/+	9,17	9,96	10,79	11,3	1										

Annexe 2 : Paramètres des souriceaux

ID mère	groupe	génotype mère	ID souriceau	sexe	date de naissance	date d'euthanasie	poids (g)	glycémie mère (g/L)	glycémie souriceau (g/L)
F6-643-670	1	-/-	4	mâle	19/06/2023	29/06/2024	4,98	1,15	1,19
F5-195-227	1	-/-	4	mâle	19/06/2023	29/06/2025	4,78	1,12	1,00
F6-643-673	1	-/-	2	mâle	21/06/2023	30/06/2023	4,63	1,38	0,99
F5-615-680	1	-/-	2	femelle	21/06/2023	30/06/2023	4,66	1,21	1,18
F5-196-237	1	-/-	3	mâle	30/06/2023	07/10/2023	5,11	1,63	1,01
F5-201-248	2	+/+	2	femelle	20/06/2023	29/06/2023	4,82	1,26	1,24
F5-195-226	2	+/+	2	femelle	19/06/2023	29/06/2026	5,5	1,26	1,32
F6-633-659	2	+/+	3	femelle	25/06/2023	07/04/2023	4,69	1,19	0,86
F5-201-246	2	+/+	6	femelle	28/06/2023	07/07/2023	5,57	1,25	1,23
143	3	+/+	2	mâle	24/06/2023	07/04/2023	5,55	0,94	0,94
144	3	+/+	2	mâle	24/06/2023	07/04/2023	5,35	1,12	1,07
145	3	+/+	6	femelle	07/01/2023	07/11/2023	5	1,37	0,94
171	3	+/+	1	mâle	07/11/2023	20/07/2023	4,51	1,09	1,10
170	3	+/+	7	mâle	29/07/2023	08/07/2023	4,75	1,39	1,37

ID mère	groupe	génotype mère	ID souriceau	sexe	contenu stomacal (g)	poids foie (mg)	Poids rein (mg)	Poids coeur (mg)	Taille tibia (mm)
F6-643-670	1	-/-	4	mâle	0,0317	141,1	30,0	32,8	9,00
F5-195-227	1	-/-	4	mâle	0,0267	140,1	30,4	31,9	8,70
F6-643-673	1	-/-	2	mâle	0,0104	102,8	31,7	26,6	8,20
F5-615-680	1	-/-	2	femelle	0,0726	128,8	29,9	32,2	8,96
F5-196-237	1	-/-	3	mâle	0,0654	104,0	25,5	23,6	8,71
F5-201-248	2	+/+	2	femelle	0,1014	141,6	32,3	27,6	8,30
F5-195-226	2	+/+	2	femelle	0,0537	160,4	33,5	38,2	8,96
F6-633-659	2	+/+	3	femelle	0,0532	121,2	27,6	33,0	8,70
F5-201-246	2	+/+	6	femelle	0,0993	168,6	35,5	36,0	8,46
143	3	+/+	2	mâle	0,0697	147,8	38,5	34,3	9,10
144	3	+/+	2	mâle	0,0538	149,8	31,5	28,0	9,06
145	3	+/+	6	femelle	0,0320	145,0	32,0	37,9	8,25
171	3	+/+	1	mâle	0,0622	126,0	26,0	28,0	7,79
170	3	+/+	7	mâle	0,0669	126,2	28,8	22,0	8,18

Annexe 3 : Paramètres des mères

ID mère	groupe	génotype mère	date de naissance	date d'euthanasie	poids (g)	poids foie (mg)	Poids rein (mg)	Poids tissu adipeux (mg)	Poids coeur (mg)	Taille tibia (mm)	gastroc (mg)
F6-643-670	1	-/-	27/02/2023	18/07/2023	19,3	1190,0	120,0	118,0	102,0	17,20	104
F5-195-227	1	-/-	27/02/2023	18/07/2023	21,8	1074,0	140,0	137,0	108,0	16,90	111
F6-643-673	1	-/-	27/02/2023	19/07/2023	20,9	1056	134	126	118	16,7	102
F5-615-680	1	-/-	03/06/2023	19/07/2023	21,8	1352,0	134,0	130,0	136,0	17,00	105
F5-196-237	1	-/-	27/02/2023	28/07/2023	24,3	1439,0	155,0	167,0	123,0	17,00	108
MOYENNE	2	-/-			21,62	1222,2	136,6	135,6	117,4	16,96	106
F5-201-248	2	+/+	03/02/2023	18/07/2023	24,6	1394,0	155,0	176,0	139,0	17,00	130
F5-195-226	2	+/+	27/02/2023	18/07/2023	25,2	1231,0	146,0	196,0	130,0	16,80	138
F6-633-659	2	+/+	27/02/2023	24/07/2023	23	1252,0	138,0	144,0	111,0	17,30	123
F5-201-246	2	+/+	03/02/2023	26/07/2023	23,5	1390,0	153,0	189,0	118,0	17,70	133
174	2	+/+	04/06/2023	16/08/2023	26	1209,0	138,0	220,0	103,0	17,00	123
MOYENNE	2	+/+			24,46	1295,2	146	185	120,2	17,16	129,4
143	3	+/+	19/03/2023	24/07/2023	25,3	1251,0	142,0	234,0	115,0	17,50	138
144	3	+/+	19/03/2023	24/07/2023	25,4	1295,0	162,0	175,0	116,0	17,40	116
145	3	+/+	19/03/2023	30/07/2023	25,9	1461,0	171,0	195,0	124,0	17,00	134
171	3	+/+	04/03/2023	08/08/2023	26,4	1337,0	160,0	136,0	116,0	17,00	127
170	3	+/+	04/03/2023	28/08/2023	26,2	1386,0	156,0	158,0	122,0	17,00	123
MOYENNE	3	+/+			25,84	1346	158,2	179,6	118,6	17,18	127,6

Annexe 4 : Analyse lipidomique en quantité relative

	%	F6-643-670 N°4	F5-195-227 N°4	F6-643-673 N°2	0,123754786	F5-196-237 N°3	F5-201-248 N°2	F6-633-659 N°3	F5-201-246 N°6	F5-195-226 N°2	0,098645267	171 N°1	170 N°7	143 N°2	144 N°2	
SAFA	L_C8_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C10_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C11_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C12_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C13_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C14_0	11%	14%	6%	10%	17%	14%	12%	14%	14%	8%	13%	11%	9%	10%	11%
	L_C15_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	L_C16_0	31%	34%	38%	40%	38%	34%	33%	35%	32%	30%	39%	34%	31%	31%	31%
	L_C17_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	L_C18_0	2%	3%	3%	3%	3%	2%	3%	2%	3%	2%	2%	3%	3%	3%	3%
	L_C20_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	L_C21_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	L_C22_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	L_C23_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
L_C24_0	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
MAFA	L_C14_1w7	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C15_1w7	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C16_1w9	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C16_1w7	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	
	L_C17_1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C18_1w9c	23%	19%	19%	17%	14%	17%	19%	18%	22%	21%	16%	20%	21%	21%	
	L_C18_1w9t	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C18_1w7c	2%	2%	2%	2%	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	
	L_C20_1w9	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	1%	1%	
L_C22_1w9	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
L_C24_1	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
PUFA	L_C16_2w6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C16_2w4	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C16_3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C16_4w3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C18_2w6c	21%	21%	23%	22%	20%	22%	23%	21%	24%	22%	22%	23%	24%	24%	
	L_C18_2w6t	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C18_3w6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C18_3w3	1%	1%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	1%	2%	2%	2%	2%	
	L_C18_4w3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C20_2w6	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	
	L_C20_3w3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
	L_C20_3w6	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	
	L_C20_4w6	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%	
	L_C20_5w3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
L_C22_2w6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
L_C22_3w3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
L_C22_4w6	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
L_C22_5w3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
L_C22_6w3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
	%	F6-643-670 N°4	F5-195-227 N°4	F6-643-673 N°2	0,123754786	F5-196-237 N°3	F5-201-248 N°2	F6-633-659 N°3	F5-201-246 N°6	F5-195-226 N°2	0,098645267	171 N°1	170 N°7	143 N°2	144 N°2	
	Saturated	44%	51%	47%	53%	58%	51%	47%	52%	43%	46%	53%	46%	44%	45%	
	Mono-insaturated	28%	23%	24%	21%	18%	21%	23%	22%	27%	26%	20%	25%	25%	26%	
	Poly-insaturated	28%	26%	29%	26%	24%	28%	30%	26%	30%	28%	27%	29%	30%	30%	
	Total (check)	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	

Annexe 5 : Calcul de l'anabolisme des mères

ID mère	Groupe	masse accouplement (g)	Masse j4 (g)	masse J13 (g)	Anabolisme absolu J13-acc	Anabolisme absolu J13-J4	Anabolisme relatif acc-J13	Anabolisme relatif J13-J4
670 (-/-)	1	15,1	21,5	22,6	7,5	1,1	49,7	5,1
680 (-/-)	1	16,9	24,1	26,1	9,2	2	54,4	8,3
227 (-/-)	1	17,8	23,9	25,9	8,1	2	45,5	8,4
673 (-/-)	1	15,5	21,1	21,9	6,4	0,8	41,3	3,8
237 (-/-)	1	18,8	27,9	29,72	10,92	1,82	58,1	6,5

248 (+/+)	2	19,6	27,4	29,3	9,7	1,9	49,5	6,9
226 (+/+)	2	20,9	29,1	29,6	8,7	0,5	41,6	1,7
659 (+/+)	2	17,3	23,6	27,09	9,79	3,49	56,6	14,8
246 (+/+)	2	18,9	28,2	29,15	10,25	0,95	54,2	3,4
174 (+/+)	2	20	27,1	28,1	8,1	1	40,5	3,7

144 (+/+)	3	20,2	28,9	30,86	10,66	1,96	52,8	6,8
143 (+/+)	3	19,3	29,4	30,2	10,9	0,8	56,5	2,7
145 (+/+)	3	19,4	27,7	31,15	11,75	3,45	60,6	12,5
171 (+/+)	3	21	29,5	32,2	11,2	2,7	53,3	9,2
170 (+/+)	3	20,1	28,5	32,4	12,3	3,9	61,2	13,7

IMPACT DE LA PERTE DE FONCTION DU GÈNE HACD1 SUR LA GESTATION ET LA LACTATION DE LA SOURIS

AUTEUR : Antoine RAMONT

RÉSUMÉ :

La myopathie congénitale liée au gène *HACD1* est une maladie rare touchant quelques familles humaines à travers le monde ainsi qu'une lignée de Labradors retrievers. La mutation du gène *HACD1* perturbe le cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne. Il a été démontré chez des souris mutantes pour le gène *Hacd1* (*Hacd1-KO*) un défaut de fonctionnement mitochondrial dans les fibres musculaires, à l'origine d'une faiblesse à l'effort et d'une résistance à la prise de poids par excès de dépense énergétique à l'échelle cellulaire.

La gestation et la lactation sont des mécanismes physiologiques demandant aux femelles des besoins métaboliques accrus. De plus, les acides gras à très longue chaîne font partie de la composition des lipides présents dans le lait et ont un rôle important dans le développement du nouveau-né. Le but de ce travail était d'analyser les conséquences de la mutation du gène *Hacd1* chez des souris *Hacd1-KO* à la fois au cours de la gestation et de la lactation.

Avec trois groupes d'études (femelles *Hacd1-KO* et mâle *wild type* (WT), femelles WT et mâles *Hacd1-KO* puis femelles et mâles WT) nous avons pu mettre en évidence que les femelles *Hacd1-KO* réussissent à mener à bien la gestation et la lactation, sans perdre de poids, et à amener leurs petits jusqu'au sevrage malgré un léger déficit pondéral chez les souriceaux issus de mère *Hacd1-KO* par rapport à ceux issus de mère WT. Nous avons aussi pu observer une différence de poids entre les souriceaux hétérozygotes et les souriceaux WT pour la mutation du gène *Hacd1*, laissant suspecter l'existence d'un phénotype intermédiaire de la myopathie sur le plan métabolique.

Aucune différence n'a été observée dans la taille des portées des trois groupes, la fertilité ne semblait donc pas altérée par la mutation du gène *Hacd1*. De même, aucune différence dans la composition du lait n'a été mise en évidence chez les femelles *Hacd1-KO* laissant supposer qu'*HACD1* a peu de rôle dans l'élongation des acides gras du lait.

MOTS CLÉS :

HACD1, MYOPATHIE CENTRONUCLÉAIRE, ACIDE GRAS À TRÈS LONGUE CHAÎNE, SOURIS HACD1-KO, LACTATION, GESTATION.

JURY :

Président : Pr Alain Fontbonne

Directrice de thèse : Pr Fanny Pilot-Storck

Examineur : Pr Sylvain Bellier

IMPACT OF LOSS-FUNCTION OF THE HACD1 GENE ON GESTATION AND LACTATION IN MICE

AUTHOR: Antoine RAMONT

SUMMARY:

Congenital myopathy linked to the *HACD1* gene is a rare disease affecting few human families around the world, as well as a line of Labradors retrievers. Mutation of the *HACD1* gene disrupts the elongation cycle of very long-chain fatty acids. Mutant mice for the *Hacd1* gene (*Hacd1*-KO) exhibit a mitochondrial function defect in muscle fibres, resulting in weakness during exercise and resistance to weight gain due to an increased energy expenditure at cellular level.

Gestation and lactation are highly energy-demanding physiological mechanisms for females. In addition, very long-chain fatty acids are part of the lipid composition of milk and play an important role in the development of the newborn. The aim of this study was to analyze the consequences of *Hacd1* loss of function in *Hacd1*-KO mice during both gestation and lactation.

With three study groups (*Hacd1*-KO females and wild type (WT) males, WT females and *Hacd1*-KO males and then WT females and males), we were able to demonstrate that *Hacd1*-KO females manage to complete gestation and lactation without losing weight, and to bring their pups to weaning despite a slight weight deficit in *Hacd1*-KO compared to WT pups. We were also able to observe a difference in weight between *Hacd1* heterozygous and WT mice for the *Hacd1* gene mutation, suggesting an intermediate metabolic phenotype in heterozygotes.

There was no difference in litter size between the three groups, so fertility did not appear to be affected by *Hacd1* gene mutation. Similarly, no difference in milk composition was observed in *Hacd1*-KO females, suggesting that HACD1 has little role in milk fatty acids elongation.

KEYWORDS:

HACD1, CENTRONUCLEAR MYOPATHY, VERY LONG CHAIN FATTY ACID, MICE HACD1-KO, LACTATION, GESTATION.

JURY:

Chairperson: Pr Alain Fontbonne

Thesis Director: Pr Fanny Pilot-Storck

Reviewer: Pr Sylvain Bellier