

N° d'ordre : 2586

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT,
GEOSCIENCES ET SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

Par Mademoiselle **Catherine MOYEN**

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU ROLE BIOLOGIQUE D'UNE
PROTEASE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANTE (LA μ -CALPAINE)
AU COURS DE LA MYOGENESE**

Soutenu le 22 Novembre 2002

Après l'avis de :

Mme N. THEZE THIEBAUD, Professeur à l'Université BORDEAUX 2
Mr D. BECHET, Chargé de Recherche à l'I.N.R.A.

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de Mme, Mr

P. HIGUERET, Professeur à l'Université BORDEAUX 1
J-J. BRUSTIS, Professeur à l'Université BORDEAUX 1
P. COTTIN, Professeur à l'Université BORDEAUX 1
D. BECHET, Chargé de Recherche à l'I.N.R.A.
N. THEZE THIEBAUD, Professeur à l'Université BORDEAUX 2

Président
Rapporteur de soutenance
Examineurs

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au **laboratoire Biosciences de l'Aliment** (Institut des Sciences et Techniques des Aliments de Bordeaux) dans le cadre **d'une allocation du Ministère de la Recherche et de la Technologie**.

Je tiens tout d'abord à remercier **Monsieur Patrick COTTIN**, Professeur à l'Université Bordeaux 1, pour la manière dont il a guidé cette recherche. Ses compétences, sa disponibilité et ses encouragements ont fait de lui un allié précieux au cours de ces années.

J'exprime ma plus profonde reconnaissance à **Monsieur le Professeur André Ducastaing** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Madame Nadine THEZE THIEBAUD** (Professeur à l'Université Bordeaux 2) ainsi qu'à **Monsieur Daniel BECHET** (Chargé de Recherche à l'INRA) qui, malgré leurs nombreuses occupations, ont accepté de juger ce travail et d'être présents à la commission d'examen.

Monsieur le Professeur Paul HIGUERET, Directeur de la Formation Doctorale a accepté de présider la commission d'examen. Je lui en suis extrêmement reconnaissante.

Je remercie plus particulièrement **Monsieur Jean-Jacques BRUSTIS** (Professeur à l'Université Bordeaux 1) qui m'a fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Il a toujours témoigné un grand intérêt pour ce travail. Ses conseils avisés ont toujours été présents au cours de ces années.

Je remercie **Monsieur le Professeur SORIMACHI** de l'université de Tokyo pour nous avoir gracieusement donné la séquence ADN codant pour la sous-unité catalytique de la μ -calpaine.

Je remercie également **les équipes du laboratoire INSERM U441 Athérosclérose** ainsi que celle du **laboratoire INRA Génomique du Développement et Pouvoir Pathogène** pour m'avoir permis de venir manipuler dans leurs structures ; leurs conseils et sympathie m'ont été irremplaçables.

J'exprime toute ma reconnaissance à **Messieurs Jean-Louis AZANZA** et **Jacques RAYMOND** (Professeurs à l'Université Bordeaux 1) et les remercie pour leurs encouragements.

J'adresse également mon amitié à nos **Maîtres de Conférence Philippe VESCHAMBRE** et **Abdessatar HADJ-SASSI** ; je les remercie pour le soutien et l'intérêt qu'ils m'ont apportés. Une pensée particulière pour le **Docteur Bénédicte DESVOYES** sans qui je n'aurais peut être toujours pas pu commander l'anticorps « miracle » anti- μ -calpaine.

Madame Jacqueline CASTEIX, Madame Cynthia DUBOURG, Madame Sylvie POUSSARD et **Mademoiselle Karine VUILLIER-DEVILLERS** m'ont apporté grâce à leurs compétences respectives une aide précieuse. Je tiens à leur exprimer ma gratitude. Il en est de même pour **Messieurs Pierre LOCHET** et **Jean-Michel ROBIN** qui ont de plus apporter une dose quotidienne d'humour et de gentillesse.

Je remercie tous les **étudiants en thèse et en DEA** qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont apporté leur amitié, leur soutien, leur sympathie, leur concours même si parfois tout n'est pas toujours au mieux dans le meilleur des mondes... **Mesdemoiselles Anne-Claire DOFFIN, Sandrine DULONG, Stéphanie PENEL, Katia TOUYAROT** et **Monsieur Germain MAZERES** pour toutes des discussions et les fous rire que nous avons eu ; **Mesdemoiselles Barbara DELAGE** et **Sophie PICOT** ainsi que **Monsieur Joseph TRAN** pour la formidable année que j'ai passé en leur compagnie et l'amitié qui en a résultée ; **Monsieur Sébastien GOUDENEGE** qui m'a conseillée, aidée et encouragée pour la dernière ligne droite de cette thèse et qui a pris de son temps pour relire et corriger ce manuscrit, je lui souhaite bon courage dans ses recherches.

Et puis, ces dernières lignes sont destinées aux plus proches : **mon père, ma mère, tous mes ami(e)s** et **Toi**. Je les remercie d'avoir toujours été présents à mes cotés et de m'avoir soutenue dans les bons comme dans les moments difficiles.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont encouragée, chacun à leur façon...

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	p 1
INTRODUCTION	
<u>1^{ère} partie : LES SYSTEMES PROTEOLYTIQUES</u>	p 3
I – LA VOIE LYSOSOMALE	p 4
II – LA VOIE ATP-DEPENDANTE	p 7
III – LA VOIE CALCIUM-DEPENDANTE	p 11
III.1 Identification des calpaines	p 13
III.1.1 Les calpaines ubiquitaires	p 13
III.1.2 Les calpaines tissus-spécifiques	p 14
III.2 Structure des calpaines	p 14
III.2.1 Les calpaines ubiquitaires	p 14
III.2.2 Les calpaines tissus-spécifiques	p 16
III.3 Spécificité et substrats des calpaines ubiquitaires	p 17
III.3.1 Généralités	p 17
III.3.2 Les protéines du cytosquelette, protéines contractiles et protéines associées	p 18
III.4 Régulation de l'activité des calpaines	p 21
III.4.1 Le calcium	p 21
III.4.2 La calpastatine	p 24
III.4.3 Les activateurs	p 26
III.5 Distribution tissulaire et localisation cellulaire des calpaines	p 26
III.6 Rôles physiologiques des calpaines et pathologies	p 29
III.6.1 Les calpaines ubiquitaires	p 29
III.6.2 Les calpaines tissus-spécifiques	p 30
IV – LA VOIE DES CASPASES	p 31
<u>2^{ème} partie : LA DIFFERENCIATION DE LA CELLULE MUSCULAIRE</u>	p 37
I – MISE EN PLACE DU PROCESSUS DE DIFFERENCIATION MUSCULAIRE	p 37
II – REGULATION DE LA MYOGENESE	p 38
<u>3^{ème} partie : LE SYSTEME PROTEOLYTIQUE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT ET LA DIFFERENCIATION DE LA CELLULE MUSCULAIRE</u>	p 42
OBJECTIFS	p 45
MATERIEL ET METHODES	
I – CULTURE CELLULAIRE	p 46

I.1 Prolifération cellulaire	p 46
I.2 Différenciation cellulaire	p 46
I.3 Quantification de la fusion des myoblastes	p 47
I.3.1 Fixation et coloration des cellules	p 47
I.3.2 Evaluation du pourcentage de fusion	p 47
I.4 Préparation des cellules en vue de leurs observations en microscopie électronique	p 48
I.5 Transfection des cellules eucaryotes	p 48
I.5.1 Présentation du système LacSwitch II	p 48
I.5.2 Présentation du système Tet-Regulated Expression System	p 50
I.5.3 Transfection de la lignée C2C12	p 52
I.5.4 Sélection des cellules transfectées	p 53
I.5.4.1 Système LacSwitch II	p 53
I.5.4.2 Système Tet-Regulated Expression System	p 53
II – CONSTRUCTION DU PLASMIDE RECOMBINANT POPRSVI/MCS - μ-CALPAINE ET PTET-SPLICE - μ-CALPAINE	p 54
II.1 Digestion enzymatique	p 56
II.2 Déphosphorylation à la Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	p 57
II.3 Ligation à la T4 DNA ligase	p 57
II. 4 Compétence et transformation de bactéries	p 58
II.4.1 Compétence	p 58
II.4.2 Transformation des bactéries compétentes	p 58
II.5 Extraction et purification des plasmides	p 59
II.5.1 "Miniprep"	p 59
II.5.2 Amplification d'ADN plasmidique : utilisation du PEG	p 59
III – TECHNIQUES D'ETUDE DES ACIDES NUCLEIQUES	p 60
III.1 Extraction des ARN totaux	p 60
III.2 Extraction de l'ADN génomique	p 61
III.3 Amplification enzymatique en chaîne (PCR)	p 61
III.3.1 Choix des amorces	p 61
III.3.2 Amplification enzymatique en chaîne	p 62
III.3.3 Différentes matrices utilisées	p 63
- ADN génomique	p 63
- Plasmides	p 63
- ADN issu d'une colonie bactérienne	p 63
III.4 Transcription inverse et amplification enzymatique en chaîne (RT-PCR)	p 64
III.4.1 Transcription inverse	p 64
III.4.2 Amplification enzymatique en chaîne	p 64
III.5 Contrôle des produits d'amplification et analyse électrophorétique	p 66
III.5.1 Contrôle des produits d'amplification par digestion enzymatique	p 66
III.5.2 Analyse électrophorétique	p 66
III.5.2.1 Gel de polyacrylamide	p 66
III.5.2.2 Gel d'agarose	p 67
III.6 Southern-blot	p 67

III.6.1 Marquage de la sonde oligonucléotidique	p 67
III.6.2 Préhybridation et hybridation sur membrane	p 68
III.6.3 Immunodétection	p 68
IV – TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	p 69
IV.1 Analyse électrophorétique et immunorévélation des protéines	p 69
IV.1.1 Préparation des extraits protéiques	p 69
IV.1.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	p 69
IV.1.3 Electrotransfert	p 70
IV.1.4 Immunorévélation des protéines	p 70
IV.2 Purification des calpaines ubiquitaires et dosage de leurs activités	p 72
IV.2.1 Purification partielle des calpaines ubiquitaires sur FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)	p 72
IV.2.2 Dosage de l'activité calcium-dépendante des calpaines	p 72
IV.3 Mesure de l'activité de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) par ELISA	p 73
IV.3.1 Principe du test CAT-ELISA	p 73
IV.3.2 Transfection des cellules et obtention des échantillons	p 74
IV.3.3 Test ELISA	p 74
IV.4 Mesure de l'activité luciférase	p 75
V – ANALYSE STATISTIQUE	p 76

RESULTATS

1^{ère} partie : CULTURE SECONDAIRE DE MYOBLASTES DE SOURIS :

CARACTERISATION DU MODELE EXPERIMENTAL. MISE EN PLACE ET EVALUATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ACTEURS DU SYSTEME NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT ET DE CERTAINS DE LEURS SUBSTRATS POTENTIELS

I – CARACTERISATION DE LA LIGNEE CELLULAIRE C2C12	p 77
I.1 Evolution morphologique des myoblastes en culture <i>in vitro</i>	p 78
I.2 Caractérisation de la fusion	p 79
II – EXPRESSION DES ACTEURS DU SYSTEME PROTEOLYTIQUE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT AU COURS DE LA MYOGENESE	p 80
II.1 Mise en évidence et évolution de l'expression des ARNm spécifiques des calpaines et de leur inhibiteur spécifique, la calpastatine, au cours de la différenciation musculaire	p 80
II.1.1 Mise en évidence des ARNm spécifiques	p 80
II.1.2 Evolution des ARNm des calpaines et de la calpastatine au cours de la différenciation	p 83
II.2 Mise en évidence et évolution de la quantité des protéases et de leur inhibiteur spécifique, la calpastatine, au cours de la différenciation musculaire	p 88
III – EVOLUTION DE L'EXPRESSION DE SUBSTRATS POTENTIELS DES CALPAINES UBIQUITAIRES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION	p 91
III.1 Evolution de la quantité de facteurs myogéniques	p 92
III.2 Evolution de la quantité de certaines protéines du cytosquelette et protéines associées	p 95

<u>2^{ème} partie : MISE EN PLACE DES SYSTEMES DE SUREXPRESSON DE LA μ-CALPAINE</u>	p 100
I – CONSTRUCTION DES VECTEURS DE SUREXPRESSON ET VERIFICATION DE L’INTEGRATION APRES TRANSFECTION DES MYOBLASTES	p 100
I.1 Construction des vecteurs et cartographie de restriction	p 100
I.1.1 Système LacSwitch II	p 101
I.1.2 Système Tet-Regulated Expression System	p 102
I.2 Contrôle de l’intégration des vecteurs	p 103
I.2.1 Le système LacSwitch II	p 103
I.2.1.1 Vecteur pCMVLacI	p 104
I.2.1.2 Vecteur pOPRSVI/MCS	p 105
I.2.2 Le système Tet-Regulated Expression System	p 109
II – INDUCTION DES SYSTEMES ET EFFET DU TRAITEMENT SUR L’EXPRESSION DE LA μ-CALPAINE	p 111
II.1 Induction des systèmes	p 111
II.2 Système LacSwitch II	p 112
II.2.1 Effet du traitement sur la quantité des ARNm codant pour la μ-calpaine	p 113
II.2.2 Effet du traitement sur la quantité de protéine	p 116
II.2.3 Effet du traitement sur l’activité enzymatique de la μ-calpaine	p 117
II.3 Système Tet-Regulated Expression System	p 120
II.3.1 Effet sur la quantité des ARNm codant pour la μ-calpaine	p 121
II.3.2 Effet sur la quantité de protéine	p 123
II.3.3 Effet du traitement sur l’activité enzymatique de la μ-calpaine	p 125
<u>3^{ème} partie : CONSEQUENCES DE LA SUREXPRESSON DE LA μ-CALPAINE</u>	p 127
I – EFFET DU TRAITEMENT SUR LA DIFFERENCIATION DES MYOBLASTES	p 127
I.1 Effet sur la fusion des myoblastes	p 128
I.2 Effet sur la morphologie cellulaire	p 129
II – EFFET DU TRAITEMENT SUR LES AUTRES ACTEURS DU SYSTEME PROTEOLYTIQUE CALCIUM-DEPENDANT	p 133
III – EFFET DU TRAITEMENT SUR L’EXPRESSION DE SUBSTRATS POTENTIELS DE LA μ-CALPAINE	p 136
III.1 Facteurs de transcription myogéniques	p 136
III.2 Protéines du cytosquelette et contractiles	p 139
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p 146
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p 158
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	p 185
ANNEXES	p 186

Figures

Figure 1 : Les différents mécanismes de la dégradation lysosomale.	p 5
Figure 2 : Structure et rôle des différentes régions du protéasome 26S.	p 8
Figure 3 : Séquences d'événements permettant la dégradation des protéines par le protéasome 26S.	p 10
Figure 4 : Structure des calpaines ubiquitaires.	p 15
Figure 5 : Structure de la p94.	p17
Figure 6 : Arrangement des protéines intracellulaires reliant les intégrines aux filaments d'actine.	p 20
Figure 7 : Schéma d'activation des calpaines ubiquitaires.	p 24
Figure 8 : Représentation des domaines protéiques de la calpastatine.	p 25
Figure 9 : La famille des caspases : leurs noms, leurs structures, leurs sites de clivage préférentiels, leurs groupes.	p 32
Figure 10 : Le « cross-talk » caspases/calpaines.	p 36
Figure 11 : Principaux événements et facteurs régulateurs impliqués dans le développement musculaire.	p 41
Figure 12 : Séquence d'apparition des ARNm et protéines des μ - et m-calpaines au cours de la différenciation musculaire sur des cultures primaires de myoblastes de rat.	p 43
Figure 13 : Schéma de fonctionnement du système LacSwitch II.	p 49
Figure 14 : Vecteurs du système Tet-Regulated-Expression System.	p 51
Figure 15 : Principe de fonctionnement du système Tet-Regulated Expression System.	p 52
Figure 16 : Construction du plasmide recombinant pTet-Splice - μ -calpaine.	p 54
Figure 17 : Construction du plasmide recombinant pOPRMSVI/MCS - μ -calpaine.	p 55
Figure 18 : Principe du test ELISA.	p 74
Figure 19 : Réaction de chimiluminescence induite par la luciférase.	p 75
Figure 20 : Evolution morphologique des myoblastes de la lignée C2C12 au cours de la différenciation.	p 78
Figure 21 : Courbe de fusion des myoblastes de la lignée C2C12.	p 79
Figure 22 : Séquences nucléotidiques des fragments amplifiés à partir des ARNm des calpaines et de la calpastatine.	p 81
Figure 23 : Identification des ADNc amplifiés spécifiques des μ -, m-calpaines, p94 et de la calpastatine.	p 82
Figure 24 : Analyse électrophorétique des ADNc de la m-calpaine en présence des ADNc étalons (GAPDH).	p 84
Figure 25 : Evolution des ARNm spécifiques de la μ - et de la m-calpaines au cours de la différenciation musculaire.	p 85
Figure 26 : Evolution des ARNm spécifiques de la p94 et de la calpastatine au cours de la différenciation musculaire.	p 86

Figure 27 : Evolution quantitative de la μ - et de la m-calpaines au cours de la différenciation musculaire.	p 89
Figure 28 : Evolution quantitative de la p94 et de la calpastatine au cours de la différenciation musculaire.	p 90
Figure 29 : Evolution quantitative de MyoD et Myf-5 au cours de la différenciation musculaire.	p 93
Figure 30 : Evolution quantitative de la myogénine au cours de la différenciation musculaire.	p 94
Figure 31 : Evolution quantitative de l'eitrine et de la vimentine au cours de la différenciation musculaire.	p 97
Figure 32 : Evolution quantitative de la cavéoline 3 au cours de la différenciation musculaire.	p 98
Figure 33 : Séquence nucléotidique du fragment amplifié (152 pb) à partir de l'ADNc de la μ -calpaine.	p 101
Figure 34 : Contrôle du vecteur recombinant pOPRSVI/MCS - μ -calpaine par PCR et cartographie de restriction.	p 102
Figure 35 : Contrôle du vecteur recombinant pTet-Splice - μ -calpaine par cartographie de restriction.	p 103
Figure 36 : Contrôle de l'expression de l'ARN et de la protéine Lac I dans les myoblastes transfectés par le vecteur répresseur.	p 104
Figure 37 : Identification de la séquence amplifiée correspondant au site multiple de clonage (MCS) du vecteur pOPRSVI/MCS.	p 106
Figure 38 : Contrôle de l'intégration de l'ADNc de la μ -calpaine humaine dans le génome des myoblastes de la lignée C2C12 par PCR.	p 107
Figure 39 : Identification par Southern-blot de la séquence de la μ -calpaine.	p 108
Figure 40 : Contrôle de l'intégration de l'ADNc de la μ -calpaine humaine dans le génome des myoblastes de la lignée C2C12 par PCR.	p 110
Figure 41 : Analyse électrophorétique de la co-amplification des ADNc de la μ -calpaine et de la GAPDH.	p 114
Figure 42 : Effet de l'addition d'IPTG sur la transcription de la μ -calpaine.	p 115
Figure 43 : Effet du traitement à l'IPTG sur la quantité de μ -calpaine.	p 116
Figure 44 : Chromatographie échangeuse d'anions sur MonoQ HR 5/5 (système FPLC).	p 118
Figure 45 : Immunorévélation des fractions éluées après chromatographie FPLC.	p 119
Figure 46 : Effet de l'induction à la doxycycline sur la transcription de la μ -calpaine.	p 122
Figure 47 : Effet du traitement à la doxycycline sur la quantité de μ -calpaine.	p 124
Figure 48 : Immunorévélation des fractions éluées après chromatographie FPLC et dosage de l'activité calcium-dépendante de la μ -calpaine.	p 125
Figure 49 : Incidence de la surexpression de la μ -calpaine sur la fusion des myoblastes de la lignée C2C12.	p 128

Figure 50 : Coupes longitudinales et tangentielles de myotubes issus de la lignée C2C12, non transfectés, sauvages.	p128'
Figure 51 : Faisceaux de filaments de la lignée C2C12 dans des coupes longitudinales et tangentielles à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET mais non induits.	p129'
Figure 52 : Coupes longitudinales de myotubes issus de la lignée C2C12 à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET et induits. Cytologie générale et détail à la limite entre deux types de sarcoplasme.	p130'
Figure 53 : Coupes longitudinales de myotubes de la lignée C2C12 à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET et induits.	p131'
Figure 54 : Coupes de myotubes de la lignée C2C12 à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET et induits.	p 132
Figure 55 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de m-calpaine et de calpastatine.	p 134
Figure 56 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de p94.	p 135
Figure 57 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de myogénine.	p 137
Figure 58 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de MyoD et de Myf-5.	p 138
Figure 59 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité d'ezrine et de vimentine.	p 141
Figure 60 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de cavéoline 3.	p 142
Figure 61 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de desmine et de taline.	p 143
Figure 62 : Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de fibronectine.	p 144

Tableaux

Tableau I : Nomenclature internationale des calpaines, adoptée suite au FASEB summer research conferences. 2001.	p 12
Tableau II : Caractéristiques des différentes enzymes de restriction utilisées.	p 56
Tableau III : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification enzymatique en chaîne.	p 62
Tableau IV : Caractéristiques des amorces utilisées pour la RT-PCR des ARNm des calpaines ubiquitaires, de la p94, de la calpastatine, de Lac I et de la GAPDH.	p 65
Tableau V : Caractéristiques et conditions d'utilisation des anticorps primaires utilisés en immunorévélation.	p 70

ABREVIATIONS

- ADN** : Acide déoxyribonucléique
- ADNc** : Acide déoxyribonucléique complémentaire
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BCIP** : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate
- CAT** : Chloramphénicol acétyltransférase type I
- CIAP** : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
- CK** : Créatine phosphokinase
- DEPC** : Diéthyl pyrocarbonate
- DIG** : Digoxygénine
- DMEM** : Milieu de Eagle modifié par Dubelcco
- DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- DNase** : Déoxyribonucléase
- dNTP** : 2-déoxynucléotide 5' triphosphate
- DO** : Densité optique
- DTT** : Dithiothréitol
- EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique
- EGTA** : Ethylène glycol-O, O'-bis (2 aminoéthyl)
- GAPDH** : Glycéraldéhyde 3-phospho-déhydrogénase
- HEPES** : Acide 2-N-hydroxy-pipérazine-2-N'-éthano-sulfonique
- HS** : Horse serum
- IPTG** : Isopropyl β -D-thiogalactoside
- kDa** : Kilodaltons
- LB** : L-Broth
- 2-ME** : 2-Mercaptoéthanol
- MCS** : Sites multiples de clonage
- NBT** : Nitro blue tetrazolium
- pb** : Paires de bases
- PBS** : Tampon phosphate salin
- PCR** : Amplification enzymatique en chaîne

PEG : Polyéthylène glycol

PMSF : Phényl méthane sulfonyl fluoride

Rnase : Ribonucléase

RT-PCR : Transcription inverse suivie d'une PCR

SAB : Sérum albumine bovine

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

SSC : Tampon citrate salin

SVF : Sérum de veau fœtal

TBS : Tampon Tris salin

Tris : Tris (hydroxyméthyl) aminoéthane

UF : Unités arbitraires de fluorescence

UV : Ultraviolets

AVANT-PROPOS

L'objet de cette étude s'inscrit dans la thématique générale du laboratoire, à savoir les phénomènes de protéolyse musculaire et principalement leurs implications dans les mécanismes de développement et de croissance musculaire.

Parmi les différentes voies de protéolyse cellulaire, notre équipe s'attache plus particulièrement à l'étude du système protéolytique neutre calcium-dépendant. Constitué d'enzymes ubiquitaires (μ - et m-calpaines), tissu-spécifiques (p94 dans le muscle squelettique) et d'un inhibiteur endogène spécifique (la calpastatine), ce système semble à la fois impliqué dans la régulation du rôle de certains substrats protéiques mais aussi dans certains événements ponctuels associés à des variations de la concentration calcique intracellulaire.

Au cours des dernières années, les résultats obtenus au laboratoire ont montré le rôle fondamental de la protéolyse calcium-dépendante lors de la myogenèse et notamment de la fusion des myoblastes. Par ailleurs, les travaux réalisés à partir de cultures de myoblastes embryonnaires de rat ont permis de mettre en évidence une apparition séquentielle des ARNm, des protéines et des activités des μ - et m-calpaines au cours du processus de différenciation de la cellule musculaire. Ainsi, pour la μ -calpaine, l'apparition a lieu au cours des stades tardifs, à savoir post fusionnels, alors qu'elle se produit plus précocement pour la m-calpaine. D'autre part, il est apparu que, suite à certaines situations (concentration calcique anormale, rupture de l'équilibre calpaine/calpastatine,...), ces protéases pouvaient subir des dérégulations à l'origine de pathologies parfois sévères parmi lesquelles des dystrophies musculaires.

Ces différences d'expression laissent supposer que les deux enzymes possèdent des rôles biologiques différents au cours de la myogenèse et donc des implications différentes dans le développement des pathologies.

Les finalités de la recherche présentées dans ce mémoire devraient permettre de mieux appréhender le rôle biologique de la μ -calpaine au cours de la différenciation de la cellule musculaire et de reproduire *in vitro* les circonstances pathologiques inhérentes à son dysfonctionnement. Pour ce faire, des expériences de surexpression de cette enzyme ont été entreprises.

Une stratégie permettant de contrôler ce phénomène nous a conduit, dans cette étude, à observer de façon précise les effets de la surabondance en μ -calpaine sur des cibles potentielles (protéines du cytosquelette, facteurs de transcription,...) ainsi que sur la structure myofibrillaire des cellules musculaires en différenciation.

INTRODUCTION

1^{ère} partie

LES SYSTEMES PROTEOLYTIQUES

Toute cellule vivante contrôle en permanence la qualité et la composition des molécules indispensables à ses fonctions. Ainsi, les ARN et protéines, contrairement à l'ADN qui est stable d'un point de vue métabolique, sont en perpétuel renouvellement. Bien que fondamentaux, les mécanismes impliqués dans ces phénomènes de régulation cellulaire demeurent mal connus, équilibre précaire entre processus de synthèse et de dégradation.

Deux voies majeures de dégradation sont communément décrites : la protéolyse limitée, ayant pour but la maturation ou l'activation de précurseurs enzymatiques, hormonaux ou viraux et le catabolisme protéique, permettant d'éliminer les protéines en les réduisant en acides aminés. Chaque protéine, en fonction de son rôle, de sa localisation cellulaire, de son état de modification post-traductionnel, ainsi que des conditions environnementales (stress, carences nutritionnelles ou hormonales, état de différenciation...), sera plus ou moins sensible à l'un ou l'autre des systèmes protéolytiques de la cellule ce qui se traduira par une durée de vie variable, spécifique.

Il est admis que la protéolyse cellulaire intervient de façon prépondérante dans divers phénomènes biologiques :

- la production d'énergie et le renouvellement du stock d'acides aminés lors des situations de carence ;
- le ménage cellulaire qui, d'une part, assure l'élimination rapide de protéines anormales (ayant subi des oxydations, des mutations,...) et de constituants excédentaires des structures multimériques dont l'accumulation se révélerait toxique et, d'autre part, permet le renouvellement basal et continu des protéines ;
- la régulation de l'abondance tissulaire et de l'expression de protéines dans le temps ;
- la genèse de peptides antigéniques.

Les enzymes protéolytiques impliquées dans ces phénomènes de catabolisme peuvent se situer aussi bien au niveau du cytosol et des lysosomes qu'au niveau de certains compartiments cellulaires comme les mitochondries, le réticulum endoplasmique ou le noyau. Elles sont subdivisées en deux grandes familles en fonction de la position de leur site de

coupure sur la séquence protéique : les exopeptidases et les endopeptidases. Les exopeptidases sont classées en fonction de la réaction enzymatique catalysée et les endopeptidases suivant la nature des acides aminés constituant le site actif. Il en existe quatre grandes classes : les sérine-, les cystéine-, les aspartyl-endopeptidases et les métalloendopeptidases (nomenclature Commitee (1)).

A ce jour, trois voies protéolytiques majeures ont été définies :

- la voie lysosomale ;
- la voie ATP/ubiquitine-dépendante ;
- la voie calcium-dépendante.

Récemment, une autre voie, celle des caspases, s'est révélée d'une réelle importance.

I – LA VOIE LYSOSOMALE

Les lysosomes, vésicules cytoplasmiques monomembranaires à pH interne acide (4,5 à 5,5) (Holtzman (2)) assurent la majorité des dégradations protéiques intracellulaires. Cette acidité favorise l'action de nombreuses hydrolases (RNAses, DNAses, lipases, glycosidases et protéases).

La dégradation protéique est assurée principalement par des endoprotéases appelées cathepsines. Elle s'effectue par trois mécanismes différents (Figure 1) (Carillo et *al.* (3)) :

- L'autophagie, dans laquelle on distingue la macro- et la micro-autophagies, concerne l'ensemble des protéines présentes dans le cytoplasme.

La macro-autophagie consiste en l'enroulement de la membrane du réticulum endoplasmique autour d'une partie du cytoplasme suivi de la fusion des vésicules ainsi formées avec les lysosomes (autophagolysosome, siège de la dégradation des protéines) (Dunn (4)(5)).

La micro-autophagie consiste en l'invagination de corps multivésiculaires d'origine endosomique ce qui permet l'internalisation des protéines ou des agrégats protéiques ; la fusion avec les lysosomes entraîne la dégradation de leur contenu (Haylett et Thilo (6)).

- L'hétérophagie correspond à la dégradation des protéines extracellulaires ayant pénétrées par phagocytose, pinocytose ou endocytose. Les vésicules ainsi formées (hétérophagosomes), fusionnent ensuite avec les lysosomes. Ce processus est très important dans de nombreuses

situations biologiques et notamment lors de la réponse inflammatoire ou immunitaire (synthèse du motif antigénique) (Fineschi et Miller (7)).

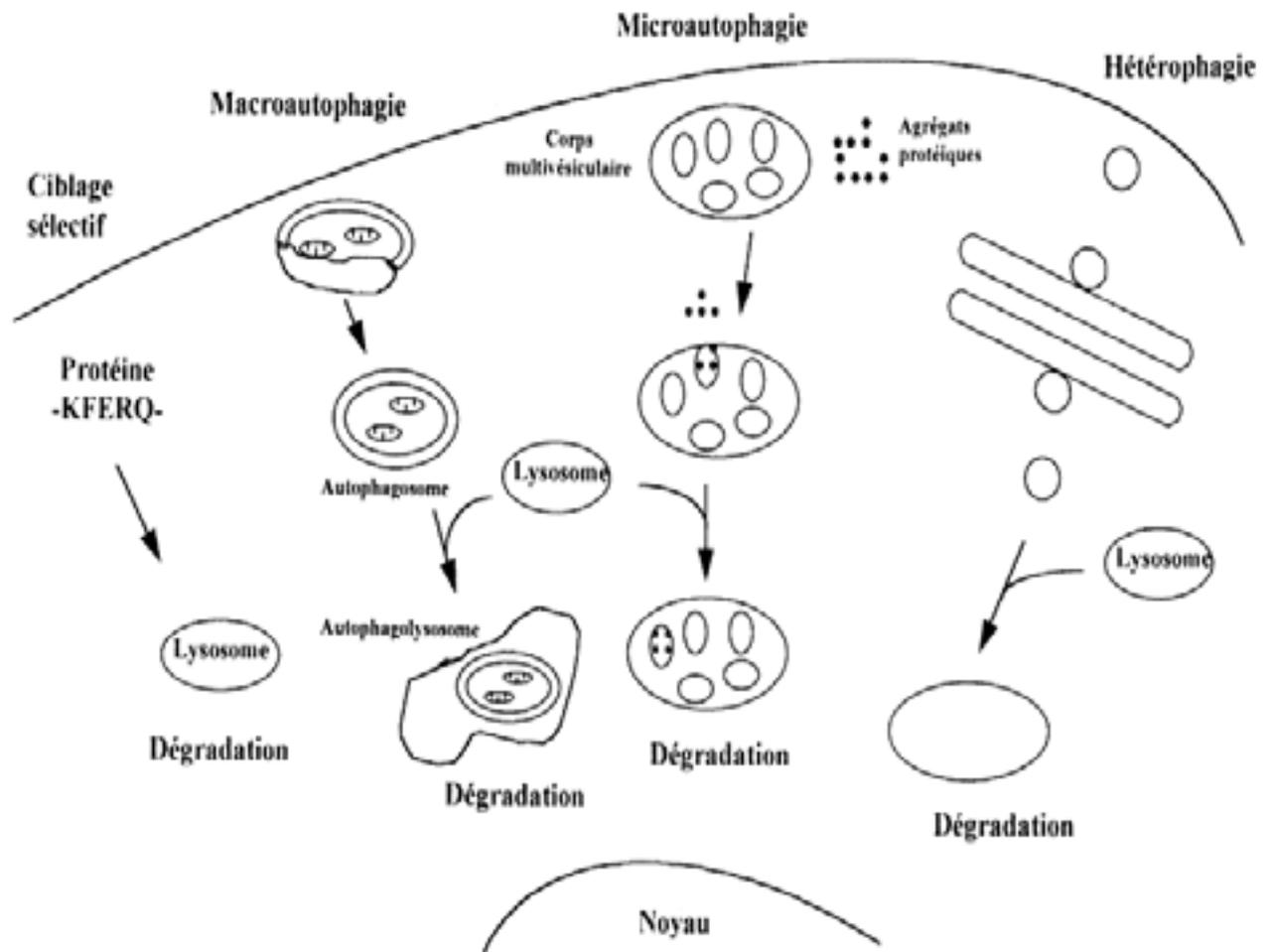


Figure 1 : *Les différents mécanismes de la dégradation lysosomale* (d'après Carillo et al. (8)).

- Le ciblage lysosomal permet le passage direct de protéines à travers la membrane du lysosome. Les protéines possédant le motif peptidique KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (Chiang et Dice (9)) empruntent cette voie. Cette activité intervient majoritairement en période de carences nutritionnelles ou hormonales et permettrait un catabolisme accru.

Dans les lysosomes du muscle squelettique, trois cystéine-endopeptidases, les cathepsines B (E.C.3.4.22.1), H (E.C.3.4.22.16) et L (E.C.3.4.22.15) ainsi qu'une aspartyl-endopeptidase, la cathepsine D (E.C.3.4.23.5), ont été mises en évidence. Un inhibiteur endogène spécifique de ces protéases, la cystatine, a également été localisé à ce niveau (Barret (10), Bond et Buttler (11)).

En ce qui concerne leurs rôles biologiques, les cathepsines pourraient être impliquées dans la protéolyse *post-mortem* (Dutson et Lawrie (12)). Au cours de la différenciation de la cellule musculaire, une augmentation de l'activité des cathepsines B et L a été observée dans les myoblastes de souris C2C12 (Ebisui et *al.* (13)) et de veau foetal (Béchet et *al.* (14)). La cathepsine H ne semble pas ou peu intervenir dans le processus. Dans la lignée L6 de myoblastes de rat, l'activité des cathepsines B, H et L diminue fortement juste avant la fusion puis augmente au cours du phénomène.

Donc, au cours de la différenciation musculaire, le système lysosomal subit une régulation conséquente.

II – LA VOIE ATP-DEPENDANTE

Le système protéolytique impliqué dans cette voie est un complexe protéique de très haute masse moléculaire, le protéasome (E.C.3.4.99.46). Il est impliqué dans la reconnaissance et la protéolyse de substrats protéiques ubiquitinés.

Le protéasome 20S est une particule cylindrique creuse d'environ 700 kDa, formée de quatre anneaux superposés. Deux types de protéines, α et β (masse moléculaire comprise entre 21 et 32 kDa) (Rivett (15)), constituent ces anneaux ; les sept sous-unités α sont localisées au niveau des anneaux externes et sont présumées jouer un rôle de structure et de régulation alors que les sept sous-unités β , positionnées au niveau des anneaux internes, porteraient l'activité catalytique.

In vitro, le protéasome 20S ne dégraderait que des protéines de faibles poids moléculaires ou des protéines oxydées et cela en absence d'ATP (Goldberg et Rock (16), Rivett (17)). Par contre, ses différentes activités peptidasiques (de type chymotrypsine, trypsine, peptidyl-glutamyl peptide hydrolase, BrAAP, SNAAP et leucine peptide hydrolase), qui lui ont valu le nom de complexe multicatalytique, expliquent le clivage de la plupart des liaisons peptidiques d'une protéine sans accumulation d'intermédiaires polypeptidiques (Wilk et Orłowski (18), Orłowski et al. (19)).

Dans la cellule, le protéasome 20S s'associe au complexe 19S, la coiffe, pour former le protéasome 26S (Peters et al. (20)) de masse moléculaire comprise entre 1500 et 2000 kDa. Cette structure régulatrice est constituée d'une quinzaine de protéines dont la masse moléculaire varie de 25 à 110 kDa (Hough et al. (21)). Le protéasome 26S présente une structure symétrique avec deux grands domaines correspondant aux deux complexes régulateurs 19S rattachés en orientation inverse de part et d'autre du domaine central constitué par le protéasome 20S (Figure 2) (Peters et al. (22), Yoshimura et al. (23)).

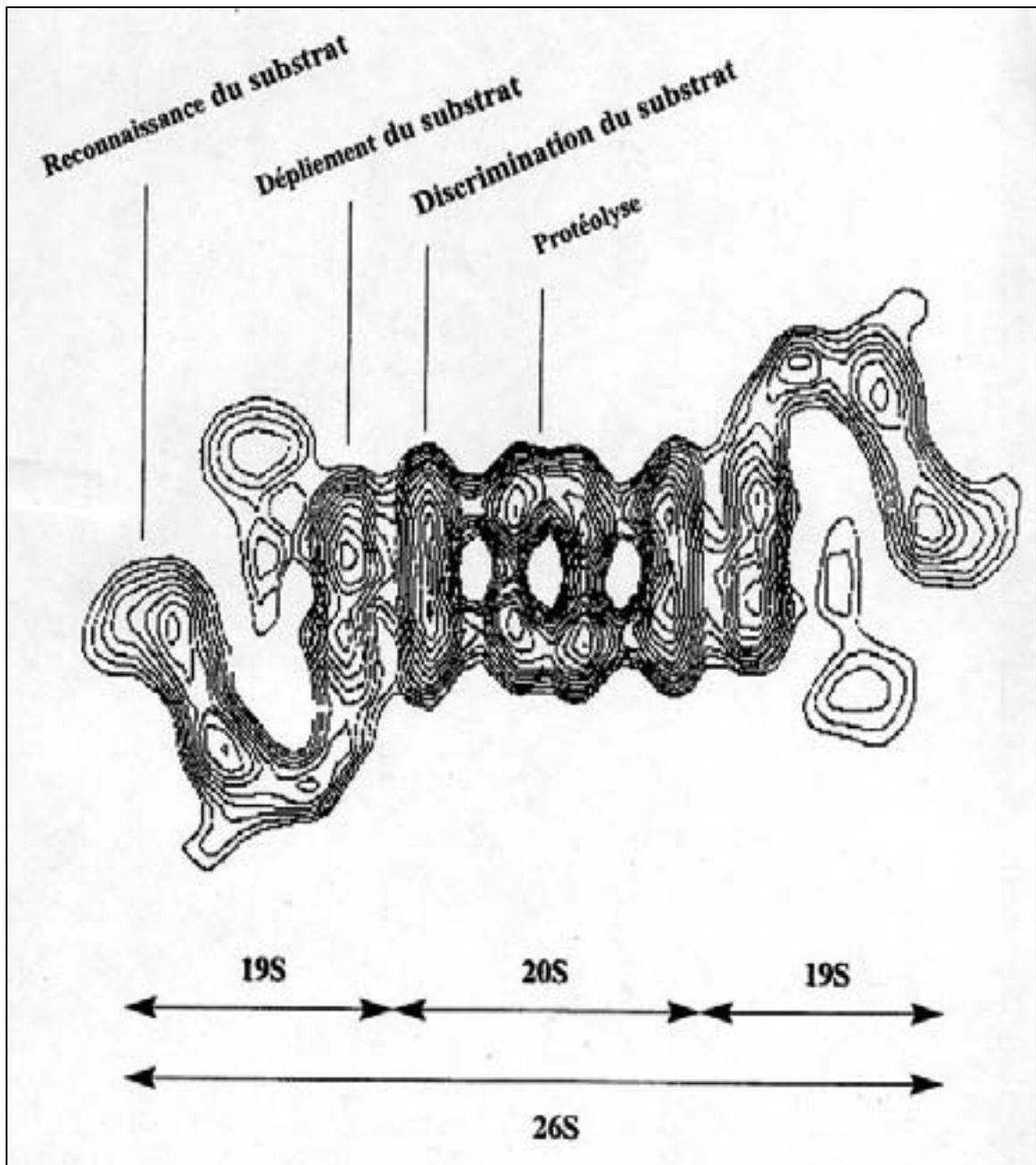


Figure 2 : *Structure et rôle des différentes régions du protéasome 26S* (d'après Koster et al. (24)).

La reconnaissance des substrats polyubiquitinés et la protéolyse dépendante de l'ATP sont associées à la présence du complexe 19S. La polyubiquitination de ces protéines destinées à la dégradation par le protéasome 26S est réalisée par un système de trois enzymes, E1, E2 et E3 (protéines de 76 acides aminés) en présence d'ATP (Ciechanover (25)) (Figure 3).

Ce système complexe a été mis en évidence à la fois dans le nucléoplasme et le cytoplasme (Peters et *al.* (26)). Il intervient dans un grand nombre de processus biologiques tels :

- la régulation du cycle cellulaire *via* la dégradation des cyclines CDK et de leurs inhibiteurs spécifiques, les CKI (Richter-Ruoff et Wolf (27)), protéolyse nécessaire pour l'entrée en phase S d'un nouveau cycle ;
- la régulation transcriptionnelle de certains gènes *via* l'hydrolyse de facteurs de transcription (p53, c-jun...) (Mori et *al.* (28)), leur maturation (NF- κ B) ou la dégradation de leurs inhibiteurs (I κ B) ;
- la régulation du métabolisme d'enzymes clefs comme l'ornithine décarboxylase ou la fructose-1, 6-biphosphatase... ;
- le contrôle et la qualité des protéines néosynthétisées en éliminant celles qui se révèlent anormales ou mal assemblées (Bonifacino (29), Werner et *al.* (30)) et en dégradant les complexes oligomériques incomplètement structurés.

Au cours de la différenciation de la cellule musculaire, différents résultats ont été obtenus. Tout d'abord, une étude réalisée par Ebisui et *al.* (31) dans la lignée musculaire C2C12 de souris a montré une activité plus importante du protéasome dans les myoblastes que dans les myotubes. Plus récemment, des expériences réalisées au laboratoire à partir de cultures primaires de myoblastes de rat (Gardrat et *al.* (32)) ou de lignée L8 de myoblastes de rat (Ueda et *al.* (33)) ont montré que l'inhibition du protéasome empêche l'apparition des myotubes.

Le protéasome semble donc jouer un rôle à la fois dans la prolifération des myoblastes et dans la différenciation des cellules musculaires.

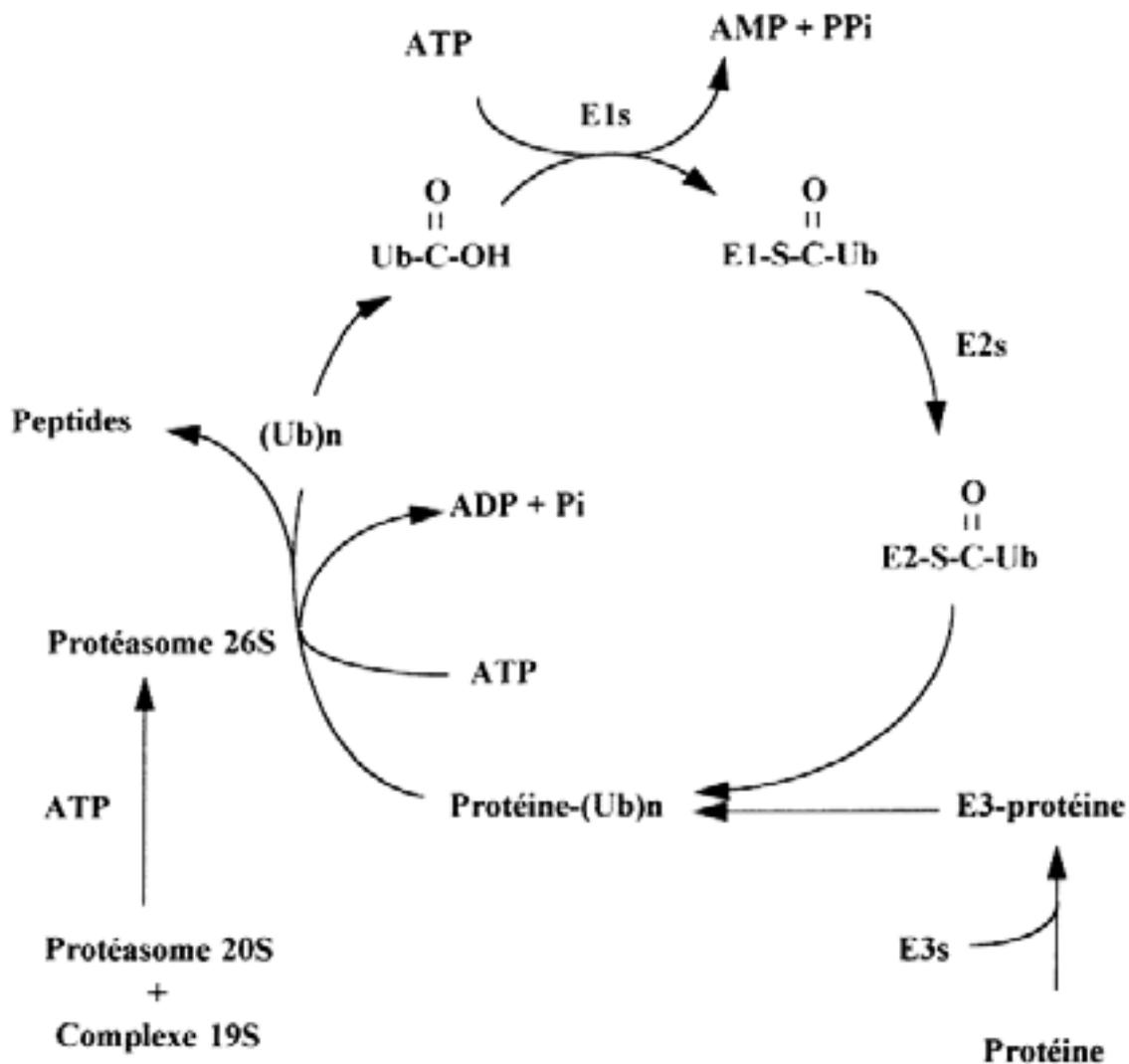


Figure 3 : *Séquences d'événements permettant la dégradation de protéines par le protéasome 26S* (d'après Hershko et Ciechanover (34)).

III – LA VOIE CALCIUM-DEPENDANTE

L'ion calcium est un transmetteur de signaux intracellulaires intervenant dans de multiples voies de signalisation (Bootman et Berridge (35)). Son mode d'action dans la contraction musculaire est probablement le processus le mieux connu, son rôle de second messenger dans les phénomènes de prolifération cellulaire, de sécrétion, d'ajustement métabolique ou de modification de l'expression de certains gènes déjà moins décrit.

La concentration intracellulaire en calcium libre varie entre 10^{-5} et 10^{-7} M. En réponse à différents stimuli, elle peut subir de rapides fluctuations par mobilisation du calcium contenu dans certains organites intracellulaires ; ces variations entraînent immédiatement une cascade d'événements cellulaires adaptée. Le calcium extracellulaire peut également agir au niveau de la cellule par liaison à la protéine réceptrice CaR ("Ca²⁺ sensing receptor") (Brown et al. (36)).

Dans la cellule, de nombreuses protéines sont capables de fixer ces ions calcium au niveau de structures appelées EF-hands (Ikura (37)). Ces domaines sont constitués de 29 résidus d'acides aminés disposés en hélice-boucle-hélice (Kretsinger et al. (38)) et capables de fixer les ions calcium avec une grande affinité (Kd de 10^{-4} à 10^{-9} M) (Ikura (39)). Suite à la fixation des ions calcium, les protéines subissent un changement de conformation entraînant une modulation de l'activité et/ou de la fonction d'autres protéines. C'est le cas notamment de la calmoduline qui provoque ainsi l'activation d'enzymes comme des phosphorylases, des kinases, des cyclases... (Klee et al. (40)).

Cette régulation cellulaire par le calcium intervient sur de nombreux systèmes enzymatiques et notamment sur la protéolyse *via* l'activation d'une famille de peptidases hydrolases appelées calpaines, enzymes impliquées dans diverses voies de signalisation intracellulaires.

Chez les mammifères, la famille des calpaines (E.C.3.4.22.17) regroupe une série d'isoformes généralement calcium-dépendantes et actives à pH neutre. Elle est divisée en deux classes : d'une part les calpaines typiques, avec des formes ubiquitaires et tissu-spécifiques et d'autre part les calpaines atypiques (Tableau I).

Calpain protein	Calpain gene	Other names	EF-hand	Tissus type	Species	Chromosome
Calpain 1	<i>capn1</i>	μ -calpaine, CAPN1	+	ubiquitous	Human Mouse Rat	11q13 19 NA
Calpain 2	<i>capn2</i>	m-calpaine, CAPN2	+	ubiquitous	Human Mouse Rat	1q41 NA NA
Calpain 3	<i>capn3</i>	nCL-1, p94, (Lp82, Lp85, Rt88)	+	skeletal muscle, lens, retina	Human Mouse Rat	15q15.1 2 NA
Calpain 5	<i>capn5</i>	htra3 nCL-3	-	ubiquitous (high in colon, small intestine and testis)	Human Mouse Rat	11q14 7 NA
Calpain 6	<i>capn6</i>	CAPNX, calpamodulin	-	placenta ?	Human Mouse Rat	Xq28 X NA
Calpain 7	<i>capn7</i>	palBH	-	ubiquitous	Human Mouse Rat	3p24-p25 NA NA
Calpain 8	<i>capn8</i>	nCL-2	+	stomach mucosa	Human Mouse Rat	1q41 NA NA
Calpain 9	<i>capn9</i>	nCL-4	+	digestive track	Human Mouse Rat	1q42 NA NA
Calpain 10	<i>capn10</i>	CAPN10, CAPN8	-	ubiquitous	Human Mouse Rat	2q37.3 NA NA
Calpain 11	<i>capn11</i>	CAPN11	+	testis	Human Mouse Rat	6p12 NA NA
Calpain 12	<i>capn12</i>	CAPN12	+	ubiquitous (high in hair follicle)	Human Mouse Rat	NA 19q13 NA
Calpain 13	<i>capn13</i>	CAPN13	+	testis, lung	Human	2p22.2-p22.3
Calpain 14	<i>capn14</i>	CAPN14	-	ubiquitous	Human	2p22.2-p22.3
Calpain 15	<i>capn15</i>	Sol H	-	ubiquitous	Human Mouse Rat	16p13.3 17A3.3 NA
Calpain small subunit 1	<i>capn-s1</i> ou <i>cpns1</i>	CAPN4	+	ubiquitous	Human Mouse Rat	19q13.1 NA NA
Calpain small subunit 2	<i>capn-s2</i> ou <i>cpns2</i>		+	NA	Human Mouse Rat	16 NA NA

Tableau I : *Nomenclature internationale des calpaines, adoptée suite au FASEB summer research conferences. 2001.*

NA = Not available

Les calpaines ubiquitaires CAPN1 (ou μ -calpaine) et CAPN2 (ou m-calpaine) se distinguent par la concentration en calcium nécessaire à leur activation *in vitro*, respectivement de l'ordre du micromolaire et du millimolaire. Des homologues structuraux des ces enzymes sont exprimés de façon majoritaire dans un tissu en particulier. C'est le cas de la calpaine 3 (CAPN3 ou p94 ou nCL-1) présente dans le muscle squelettique (Sorimachi et *al.* (41)), ou encore des nCL-2 exprimées dans le muscle lisse de l'estomac. Chez les invertébrés, différents homologues des calpaines ont été rencontrés comme les calpaines A, B, C, D chez la drosophile (Théopold et *al.* (42)) ou calpaine-1 à -7 chez *Caenorhabditis elegans* (Wilson et *al.* (43)).

Chez l'homme, le gène codant pour la μ -calpaine est localisé sur le chromosome 11 (11q13) (Pang et *al.* (44)), à proximité de celui de la CAPN5 (Matena et *al.* (45)).

Au cours de l'évolution, la superfamille des protéases neutres calcium-dépendantes a été structurellement très conservée et forme un groupe bien distinct des autres cystéine-protéases telles que les papaines, les cathepsines ou les caspases (Berti et Storer (46)).

III.1 Identification des calpaines

III.1.1 Les calpaines ubiquitaires

Ce n'est qu'en 1981 qu'apparaît le terme de calpaine (Murachi et *al.* (47)) pour identifier l'acteur d'activité protéolytique calcium-dépendante découverte en 1964 par Guroff (48) dans le cerveau de rat. Il ne lui était encore attribué qu'une fonction d'activation d'une PKC ainsi que l'hydrolyse de la strie Z (Busch et *al.* (49) et Takai et *al.* (50)).

La purification de la protéase a été réalisée pour la première fois en 1976 à partir de muscle squelettique de porc (Dayton et *al.* (51)).

Quelques années plus tard, l'ADNc codant pour la sous-unité catalytique de la calpaine de poulet sera cloné par Ohno et *al.* (52). Cette séquence est maintenant reconnue comme une forme intermédiaire entre la μ - et la m-calpaines (μ/m) (Sorimachi et *al.* (53)), les trois isoformes cohabitent. La séquence complète des sous-unités catalytique et régulatrice de la μ -calpaine a été déterminée en 1997 par Jeong et *al.* (54). Depuis, la sous-unité catalytique

des calpaines ubiquitaires a été clonée et séquencée pour de nombreuses espèces, notamment chez l'homme (Aoki et al. (55)), Imajoh et al. (56)). Il en est de même pour la petite sous-unité, dont l'ADNc a été séquencé entre autres chez le lapin (Emori et al. (57)), le porc (Sakihama et al. (58)) et la souris (Arthur et al. (59)).

Un très haut degré d'homologie entre les calpaines de différentes espèces a été mis en évidence (Sorimachi et al. (60), Kawashima et al. (61)), preuve de leur appartenance à une même grande superfamille.

III.1.2 Les calpaines tissus-spécifiques

En 1989, Sorimachi et al. (62) attestent de l'existence d'une calpaine exprimée de façon prédominante dans le muscle squelettique : la p94 (nCL-1 ou CAPN3). Par la suite, d'autres espèces de calpaines tissus-spécifiques ont été recensées chez les mammifères : Lp82 et Lp85 dans le cristallin, nCL-2 et nCL-2' dans l'estomac, nCL-3 ou CAPN5 dans les testicules, CAPN6 dans le placenta et nCL-4 ou CAPN9 dans les tubules digestifs (Sorimachi et al. (63) (64), Dear et al. (65)).

Ces enzymes sont des monomères dont la structure est homologue à celle de la sous-unité catalytique de la μ - ou de la m-calpaine. Certaines (notamment nCL-2', nCL-3 et CAPN6) n'ont pas de domaine calmoduline-like mais pourraient tout de même fixer le calcium grâce à la présence d'une structure EF-hand située entre leurs domaines II et III.

La p94 est donc la protéase neutre calcium-dépendante spécifique du muscle squelettique. Ses ARNm y sont dix fois plus exprimés que ceux des calpaines ubiquitaires (Sorimachi et al. (66)).

III.2 Structure des calpaines

III.2.1 Les calpaines ubiquitaires

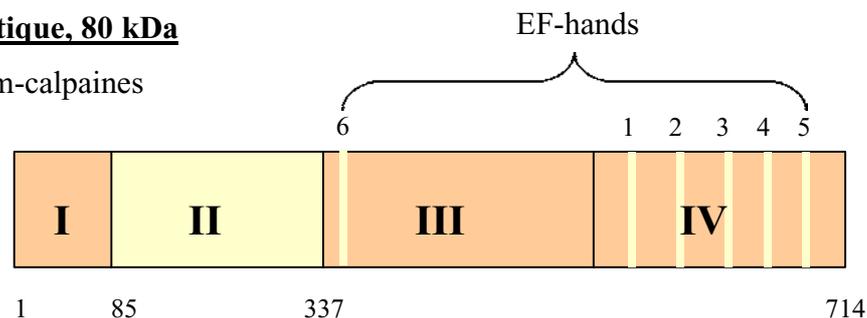
Les calpaines ubiquitaires (μ - et m-calpaines) sont des protéines hétérodimériques. Elles possèdent une sous-unité catalytique de 80 kDa propre à chaque enzyme, codée par deux gènes distincts pour les deux isoformes (Wheelock (67)) et une sous-unité régulatrice de 30 kDa commune aux deux isoformes (Kawasaki et Kawashima (68)).

La sous-unité catalytique s'organise en quatre domaines (Figure 4). Les fonctions du domaine I restent encore relativement inconnues malgré son implication *in vitro* dans l'autolyse de la sous-unité catalytique qui précède l'activité protéolytique. Le domaine II ou domaine cystéine-protéase contient le site actif de l'enzyme formé par l'association de trois acides aminés : une cystéine (position 108), une histidine (position 265) et une asparagine (position 286). Il présente un fort degré d'homologie avec les autres cystéine-protéases (papaines, cathepsines B et H) (Ono *et al.* (69)).

Le domaine III serait responsable d'un changement de conformation permettant une meilleure accessibilité au site actif (Goll *et al.* (70), Molinari et Carafoli (71)). Les structures EF-hands, capables de fixer les ions calcium, sont regroupées au niveau du domaine IV ou domaine "calmoduline-like" ; quatre de ces motifs y ont été localisés (Ohno *et al.* (72), Emori *et al.* (73), Minami *et al.* (74)). Une structure supplémentaire a été mise en évidence à la jonction des domaines II et III (Andresen *et al.* (75)).

Sous-unité catalytique, 80 kDa

μ , μ/m , et m-calpaines



Sous-unité régulatrice, 30 kDa

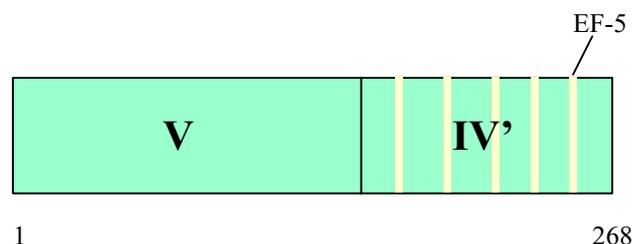


Figure 4 : *Structure des calpaines ubiquitaires* (d'après Sorimachi *et al.* (76)).

La sous-unité 30 kDa est constituée de deux domaines séparés par une région riche en résidus proline (Figure 4). Le domaine V ou partie N-terminale, riche en glycine et acides aminés hydrophobes, possède un site d'autolyse. Ses propriétés d'hydrophobicité pourraient lui

permettre d'interagir avec les phospholipides membranaires. (Imajoh et *al.* (77), Garret et *al.* (78)). Le domaine IV' ou VI, fortement homologue au domaine IV de la sous-unité catalytique, contient cinq structures EF-hands. Le dernier de ces motifs (EF-5) a été identifié par études cristallographiques de la sous-unité (Théopold et *al.* (79)). Il a été établi, par comparaison des séquences des domaines IV' et IV, que la sous-unité de 80 kDa contenait aussi cette structure EF-hand à l'extrémité N-terminale du domaine IV. Alors que les quatre premières EF-hands contribuent à la fixation des ions calcium, la cinquième, située en C-terminal participerait avec son homologue de la sous-unité 80 kDa à la dimérisation (Blanchard et *al.* (80), Lin et *al.* (81), Hosfield et *al.* (82)).

Ces résultats laissent supposer l'implication des deux motifs EF-5 de chacune des sous-unités dans le maintien de la conformation hétérodimérique naturelle des calpaines (Elce et *al.* (83)).

III.2.2 Les calpaines tissus-spécifiques

La p94 est une protéine monomérique de 821 acides aminés (94 kDa) constituée de quatre domaines distincts (I, II, III, IV) dont la structure est homologue à celle de la sous-unité catalytique des calpaines ubiquitaires (Sorimachi et *al.* (84)) (Figure 5).

Elle comporte également trois régions spécifiques, NS (pour "N-terminal Sequence"), localisée dans le domaine N-terminal, IS1 (pour "Insertion Sequence 1") dans le domaine protéolytique et IS2 (pour "Insertion Sequence 2") entre les domaines III et IV. La fonction de la région NS, riche en proline, reste encore à déterminer bien qu'elle divise le domaine I supposé jouer un rôle important dans la structure de la sous-unité catalytique des calpaines ubiquitaires. Le domaine II, responsable de l'activité protéolytique est très conservé et notamment au niveau du site actif. IS1 pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité protéolytique de l'enzyme de par sa proximité du site actif. IS2 contient une séquence de localisation nucléaire riche en résidus lysine permettant la translocation de la p94 du cytosol vers le noyau (Sorimachi et *al.* (85)).

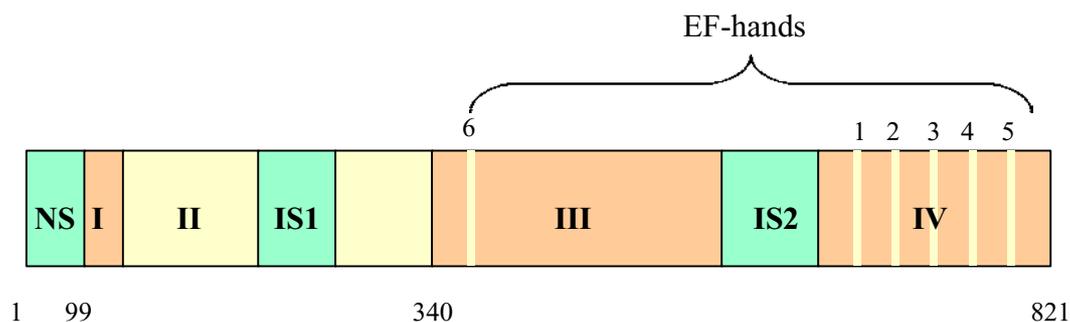


Figure 5: *Structure de la p94* (d'après Sorimachi et al. (86)).

III.3 Spécificité et substrats des calpaines ubiquitaires

III.3.1 Généralités

Les calpaines ubiquitaires ont une activité de protéolyse limitée conduisant à la formation de peptides de masse moléculaire importante. Elles participent d'avantage à la régulation de l'activité de leurs substrats (activation d'une enzyme par exemple) qu'à leur catabolisme. Il n'existe pas de différences majeures dans la spécificité de substrat entre les deux isoformes. Pour Melloni et al. (87), la spécificité des calpaines ubiquitaires résulterait de la présence d'épitopes spécifiques au niveau des protéines contenant des domaines multifonctionnels, qui sont soit inaccessibles soit exposés en fonction de la conformation du site de clivage.

Une autre hypothèse consisterait à dire que la détermination d'une protéine en qualité de substrat de ces protéases neutres calcium-dépendantes serait due à la présence de séquences PEST (proline, glutamine, sérine et thréonine) ; la proximité des quatre acides aminés, en permettant la séquestration des ions calcium, favoriserait l'action des calpaines en présence de concentrations calciques physiologiques (Rogers et al. (88), Harris et al. (89), Shumway et al. (90)). Cependant, il semblerait que la présence de la séquence PEST dans la structure primaire d'une protéine ne soit ni nécessaire ni suffisante pour la considérer comme substrat des calpaines (Nixon et al. (91), Carillo et al. (92)). En effet, toutes les protéines clivées ne possèdent pas nécessairement cette séquence consensus, la mutation de cette structure ne prévenant pas leur dégradation (Molinari et al. (93)).

De la comparaison des sites de clivage pour un certain nombre de substrats peptidiques et protéiques *in vitro* (Croall et Demartino (94)), une certaine homologie dans la séquence en acides aminés de ces protéines hydrolysées s'est dégagée : présence d'acides aminés basiques en position P1 du site de coupure, d'acides aminés hydrophobes en position P2 et structure tridimensionnelle particulière des protéines substrats (Sakai et *al.* (95)).

L'ensemble des substrats des calpains ubiquitaires peut être divisé en quatre grands groupes :

- **protéines du cytosquelette et contractiles** : dystrophine (Cottin et *al.* (96)), desmine (Dourdin et *al.* (97)), fodrine, vinculine, filamine, taline, actine (Villa et *al.* (98)), troponine (Di Lisa et *al.* (99)), tropomyosine, calponine (Yoshimoto et *al.* (100)), ...;
- **enzymes** : protéine kinase C (Verret et *al.* (101)), phospholipase C, phosphorylase b kinase, phosphatases (calcineurine), pp60 src,... ;
- **protéines membranaires** : récepteurs à l'EGF et au PDGF, A-CAM (Sato et *al.* (102)), sous-unité $\beta 3$ des intégrines (Du et *al.* (103)), cadhérine, protéine $G_s\alpha$ (Sato-Kusubata et *al.* (104)),... ;
- **autres** : cytokines, facteurs de transcription tels que myogénine, p53, I κ B α (Shumway et *al.* (105)), AP1, c-Fos, c-Jun, c-Myc (Watt et *al.* (106)), protéines nucléaires (Mellgren (107)), pro-caspases (Blomgren et *al.* (108)), Chua et *al.* (109)), Bax (Choi et *al.* (110)),....

III.3.2 Les protéines du cytosquelette, protéines contractiles et protéines associées.

Le cytosquelette est un réseau de fibres intracellulaires constitué de trois grandes familles de protéines : les filaments épais de tubuline (les microtubules), les filaments fins d'actine (les microfilaments) et les filaments intermédiaires.

Les microtubules sont impliqués dans la répartition des éléments intracytoplasmiques. Ils sont responsables d'une part de l'intégrité des structures cellulaires, forme et rigidité et d'autre part des mouvements intracytoplasmiques. Ils sont formés par la polymérisation des

tubulines- α et **β** . Ils jouent un rôle dans la morphogenèse en permettant l'élongation des cellules lors de la différenciation cellulaire.

Les microfilaments sont des filaments fins constitués d'un coeur d'**actine** associé à diverses protéines accessoires. Ils sont impliqués dans des mouvements de grande ampleur impliquant la déformation de la structure cellulaire : contraction, migration, formation de pseudopodes. Ils constituent un support qui permet d'ancrer un certain nombre d'organites cytoplasmiques tels que les vésicules du réticulum endoplasmique, les microtubules et les polysomes. Il existe un très grand nombre de protéines et d'isoformes qui interagissent avec l'actine monomérique ou polymérique ; le but de ce paragraphe n'est pas de répertorier ces protéines de manière exhaustive mais de resituer la place et la fonction de certaines d'entre elles.

Les microfilaments sont inclus dans deux grands réseaux filamenteux : un réseau sous membranaire et les câbles de stress. Le premier est constitué de filaments d'actine formant une sorte de charpente servant au contrôle de la forme et participant au déplacement. Les câbles de stress sont des filaments d'actine ancrés d'un côté à la membrane plasmique au niveau des points focaux et de l'autre à un point focal de la membrane opposée ou à une structure cytoplasmique appelée corps dense ; ce pontage rigidifie la cellule. Le regroupement des intégrines induit la création des contacts focaux où la matrice extracellulaire est mise en contact avec le cytosquelette. Un complexe de protéines se forme autour des clusters d'intégrines. La **taline** s'attache aux intégrines, ensuite la **vinculine** se lie à la taline et à l' **α -actinine** qui à son tour se lie à l'actine du cytosquelette (Figure 6).

D'autres protéines viennent s'organiser en périphérie de ce premier édifice. La **desmine**, présente dans la région des disques Z sert à attacher ensemble des sarcomères adjacents. La **vimentine** qui, avec la desmine, est un constituant des filaments intermédiaires, est associée aux microtubules. La **dystrophine**, protéine sarcoplasmique située sous la membrane plasmique, permet l'accrochage des filaments d'actine de la cellule musculaire à la laminine de la membrane basale. L'**ezrine**, qui appartient à la famille de protéines ERM (Ezrin, Radixin, Moesin), permet l'ancrage de l'actine du cortex cellulaire à la membrane plasmique. La **spectrine** interagit également avec l'actine et fascicule ou réticule le polymère. La **fibronectine** est un constituant essentiel de la matrice extracellulaire ; elle est synthétisée et sécrétée par la cellule. Elle se lie aux collagènes, aux protéoglycanes (héparan sulfate) et à la laminine.

Outre le domaine correspondant à des plaques d'adhérence impliquées comme nous venons de le voir dans l'accrochage des filaments d'actine de la cellule aux molécules de la matrice extracellulaire, un autre domaine, appelé cavéolaire, a été mis en évidence. Il est riche en invaginations vésiculaires ou *caveolae* dont la principale protéine constitutive est la **cavéoline**. Les *caveolae* se trouvent dans le sarcolemme au niveau du disque Z (tubule T). A cet endroit, le complexe dystrophine-protéines associées a été localisé. Il présente de nombreux récepteurs notamment à la laminine qui permet l'adhérence de la cellule à la matrice extracellulaire ainsi que des canaux calciques et potassiques.

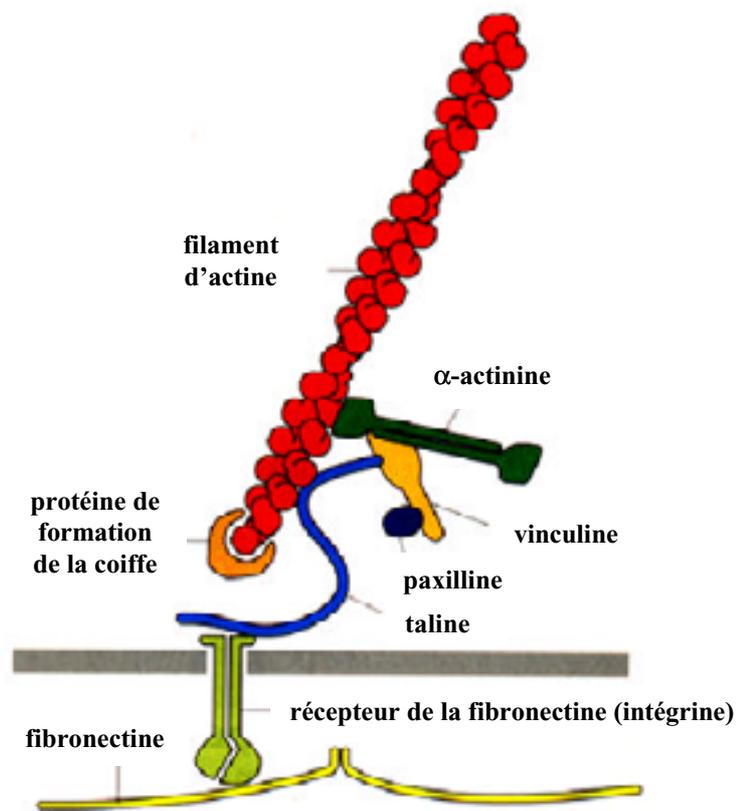


Figure 6 : *Arrangement des protéines intracellulaires reliant les intégrines aux filaments d'actine.*

III.4 Régulation de l'activité des calpaines

Toute activité enzymatique nécessite l'intervention de systèmes régulateurs afin de préserver l'intégrité cellulaire.

III.4.1 *Le calcium*

La concentration calcique intracellulaire est probablement l'un des facteurs le plus important dans la régulation de l'activité des **calpaines ubiquitaires**. Nous avons vu que les deux isoformes étaient des enzymes protéolytiques calcium-dépendantes et que leurs activités *in vitro* dépendaient de concentrations en ions calcium différentes comprises entre 3 et 50 μM pour la μ -calpaine et entre 0,2 et 1 mM pour la m-calpaine (Goll et *al.* (111)).

Actuellement, deux grandes hypothèses concernant le mécanisme d'activation de ces protéases s'affrontent. La première consisterait à considérer les calpaines natives comme des proenzymes nécessitant une autoprotéolyse pour leur activité. La seconde impliquerait, préalablement au clivage du substrat, la dissociation du complexe 80 kDa/30 kDa.

Hypothèse de l'autoprotéolyse (Figure 7)

La forme hétérodimérique 80 kDa/30 kDa des calpaines serait alors une proenzyme. L'autolyse nécessaire à l'activité s'opérerait au niveau N-terminal des deux sous-unités et une forme active (76 kDa/18 kDa) en résulterait (Cong et *al.* (112), Cottin et *al.* (113), Edmunds et *al.* (114), Brown et *al.* (115)). Celle-ci aurait une sensibilité accrue pour le calcium (Goll et *al.* (116)). Lors de l'autoprotéolyse de la μ -calpaine, une forme "intermédiaire" de 78 kDa est générée avant celle complètement autolysée de 76 kDa ; toutes deux seraient actives et auraient des substrats spécifiques donc des rôles distincts (Schoenwaelder et *al.* (117)). Plusieurs équipes ont analysé la cinétique d'autolyse de ces enzymes (Saido et *al.* (118), Baki et *al.* (119), Tompa et *al.* (120)).

Cette hypothèse de l'autoprotéolyse seule est difficilement transposable *in vivo* étant donné que les concentrations calciques requises *in vitro* pour le phénomène d'autolyse sont largement supérieures au taux physiologique (0,2 à 0,8 μM). La mise en oeuvre d'un tel mécanisme *in vivo* passerait par l'interaction de l'enzyme avec les phospholipides membranaires (Arthur et Crawford (121)) et particulièrement avec le phosphatidylinositol

(Imajoh et *al.* (122)), évènement capable d'abaisser la concentration en calcium nécessaire à l'autolyse (Coolican et *al.* (123), Cong et *al.* (124), Saido et *al.* (125)).

Ainsi les calpaines, suite à un signal calcique intracellulaire, subiraient une translocation vers les membranes. Le domaine V de la sous-unité régulatrice, riche en acides aminés hydrophobes, permettrait l'ancrage de l'hétérodimère dans la bicouche phospholipidique. Ceci augmenterait la sensibilité au calcium de façon significative ce qui permettrait l'autolyse en conditions physiologiques. Cette étape entraînerait l'activation et le relargage d'une forme active (76 kDa/18 kDa) dans le cytoplasme.

Ce modèle, bien que longtemps admis, fut l'objet de nombreuses controverses. Les expériences de mutagenèse de la région N-terminale des calpaines réalisées par Elce et *al.* (126) ont montré une inhibition de l'autolyse mais pas de l'activité protéolytique. Ainsi, la forme non autoprotéolysée des protéases neutres calcium-dépendantes serait capable d'hydrolyser des substrats (Molinari et *al.* (127)). D'autre part, l'effet des phospholipides membranaires sur la sensibilité des enzymes aux ions calcium serait suffisant pour l'autoprotéolyse de la μ -calpaine mais pas pour celle de la m-calpaine. Enfin, l'insertion des calpaines dans les membranes biologiques ne serait pas due à leur association avec les phospholipides mais plutôt avec des protéines membranaires (Inomata et *al.* (128), Kuboki et *al.* (129)) ; cette association consisterait plutôt à protéger la calpaine active de son inhibiteur endogène, la calpastatine (Carafoli et Molinari (130)). Tompa et *al.* (131) ont avancé l'hypothèse d'une possible action de la μ -calpaine sur la m-calpaine ; la première, dont les besoins en calcium sont d'ordre physiologique, protéolyserait la seconde réduisant ainsi la concentration calcique nécessaire à son activation. Ce mécanisme a cependant été bien vite infirmé, la μ -calpaine ne jouant pas un rôle d'activateur pour la m-calpaine (Thompson et *al.* (132)).

L'activation des calpaines *via* un phénomène autoprotéolytique n'aurait donc pas forcément de réalité physiologique.

Hypothèse de la dissociation (Figure 7)

Cette théorie est née de la mise en évidence *in vitro* de la dissociation de l'hétérodimère en présence de calcium puis d'une activité protéolytique de la sous-unité catalytique ainsi libérée (Yoshizawa et *al.* (133) (134)).

Il semblerait que l'autoprotéolyse du domaine I facilite la dissociation, et, par conséquent, l'activation de la protéase. Selon Suzuki et Sorimachi (135), l'activation des calpaines

combinerait à la fois la dissociation des deux sous-unités, l'autoprotéolyse en N-terminal et l'action de régulateurs sur la sensibilité au calcium. Les protéases, en présence d'ions calcium, subiraient une translocation vers la membrane plasmique ; il s'ensuivrait un changement de conformation de la calpaine exposant ses régions hydrophobes à la surface de la protéine qui pourrait alors interagir avec les phospholipides membranaires. Ces interactions, tout en permettant une diminution de l'exigence en calcium, entraîneraient une autoprotéolyse suivie de la dissociation du dimère et l'activation de la sous-unité catalytique. Celle-ci pourrait alors hydrolyser des substrats membranaires ou cytoplasmiques.

Pour Molinari et *al.* (136) la dissociation ne serait pas toujours précédée de l'autoprotéolyse, et les deux formes actives des calpaines *in vivo* seraient les formes 80 kDa et 76 kDa. Une des hypothèses avancées par Suzuki et Sorimachi (137) consiste à séparer les deux types d'activation. La dissociation simple aurait un caractère réversible, alors qu'une autoprotéolyse préalable entraînerait un phénomène irréversible. Dans le cas du bien fondé de cette hypothèse, la sous-unité régulatrice 30 kDa pourrait réguler la sensibilité aux ions calcium. Pour ce faire, elle agirait soit comme un inhibiteur de l'activité protéolytique ou un pseudosubstrat soit comme une chaperonine et faciliterait le repliement de la forme 80 kDa (Graham-Siegenthaler et *al.* (138)).

Inversement, certains auteurs ont montré que les deux sous-unités restaient associées durant le processus catalytique (Zhang et Mellgren (139)). Elce et *al.* (140) ont mis en évidence que la m-calpaine ne pouvait être active que sous la forme d'un hétérodimère et que les sous-unités restaient associées en présence de calcium avant ou après hydrolyse (Dutt et *al.* (141)). En effet, ce modèle d'activation ne résout pas le problème de cet isoforme, dont le seuil activateur en calcium, reste dans toutes les hypothèses trop élevé. De nombreux travaux ont été réalisés pour clarifier le mécanisme de régulation de l'activité calpaine par le calcium ; aucun des ces résultats ne fait encore l'unanimité.

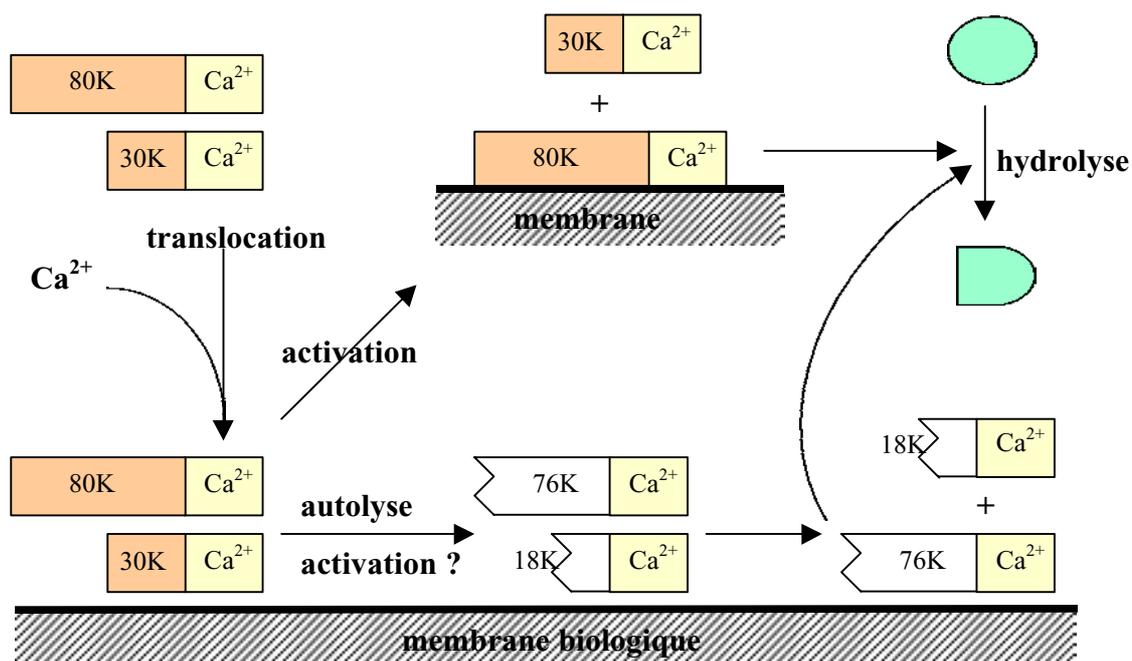


Figure 7 : *Schéma d'activation des calpaines ubiquitaires* (d'après Suzuki et al. (142)).

L'activité de la **p94** semble également régulée par le calcium bien que certains auteurs aient affirmé que le phénomène autoprotéolytique pouvait avoir lieu en son absence, aucune activité calcium-dépendante n'ayant clairement pu être prouvée (Kinbara et al. (143)). En fait, la sensibilité de la p94 vis-à-vis du calcium serait de l'ordre du nanomolaire (Branca et al. (144)) ce qui rendrait relativement difficile l'étude de cette régulation.

III.4.2 La calpastatine

Un rôle primordial dans la régulation de l'activité des calpaines ubiquitaires est tenu par l'inhibiteur endogène spécifique de ces cystéine-protéases, la calpastatine. Cette protéine est toujours co-localisée avec les protéases neutres calcium-dépendantes et permet d'inhiber l'autoprotéolyse, la translocation membranaire ainsi que l'activité protéolytique de ces enzymes (Kaprell et Goll (145), Murachi (146)).

Les séquences primaires de la calpastatine humaine, de lapin, de porc (pour revue Maki et al. (147)) et plus récemment de rat (Servadio et Casari (148)) et de souris (Lee et al. (149)) ont été déduites des ADNc clonés. Son clonage et son séquençage ont révélé l'existence de

différents types de calpastatine qui résulteraient d'épissages alternatifs. La forme la plus fréquemment exprimée possède une masse moléculaire voisine de 110 kDa en conditions dénaturantes et est constituée de cinq domaines distincts (Figure 8) : un domaine L, en N-terminal, suivi de quatre domaines similaires contenant chacun trois régions homologues répétées (A, B, C) d'environ 140 acides aminés. Récemment, une nouvelle région N-terminale, appelée XL a été mise en évidence dans la calpastatine de boeuf et de souris (Takano et *al.* (150)). La région B porterait l'activité inhibitrice (Maki et *al.* (151), Kawasaki et *al.* (152)), alors que les zones A et C potentialiseraient leurs effets en se liant respectivement aux domaines IV et IV' des enzymes (Takano et *al.* (153), Thompson (154)). Ainsi, une molécule de calpastatine pourrait inhiber plusieurs molécules de calpaine, trois à douze selon certaines études (Croall et *al.* (155)). Le domaine L, constitué d'environ 120 acides aminés, ne possède pas d'homologie avec les quatre autres et ne présente pas d'activité inhibitrice. Il pourrait se lier aux membranes biologiques *via* des interactions ioniques (Mellgren (156)).

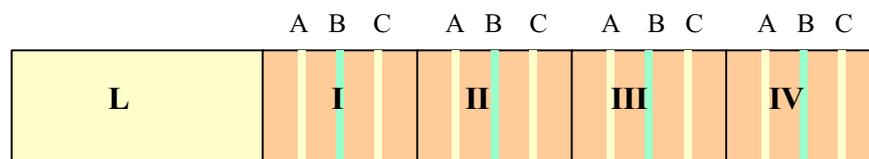


Figure 8 : **Représentation des domaines protéiques de la calpastatine** (d'après Lee et *al.* (157)).

L'inhibition des calpaines par la calpastatine est un phénomène calcium-dépendant (Cottin et *al.* (158), Kapprell et Goll (159)), les concentrations calciques requises pour lier la μ -calpaine et la m-calpaine étant de l'ordre du micromolaire et du millimolaire (Nishimura et Goll (160)). Le mécanisme de cette inhibition n'est pas clairement établi. Maki et *al.* (161) suggèrent que la région B pourrait se fixer près du site catalytique des protéases ce qui permettrait à la calpastatine d'entrer en compétition avec les substrats alors que d'autres auteurs ont montré une action de type non compétitif (Cottin et *al.* (162)).

La phosphorylation de la calpastatine par la PKA pourrait moduler son action sur les protéases : la forme phosphorylée inhiberait plus fortement la m-calpaine alors que la forme native, déphosphorylée, aurait une préférence pour la μ -calpaine (Pontremoli et *al.* (163), Salamino et *al.* (164), Cong et *al.* (165)). Ce phénomène de

phosphorylation/déphosphorylation réversible permettrait de comprendre comment les deux isoformes de calpaines peuvent être indépendamment contrôlées (Salamino et *al.* (166)).

La calpastatine permettrait de maintenir les protéases dans un état inactif, jusqu'à leur translocation au niveau membranaire.

III.4.3 Les activateurs

De nombreuses études ont été mises en oeuvre pour élucider les mécanismes qui, *in vivo*, permettraient de réduire la concentration en calcium nécessaire à l'activité des calpaines ubiquitaires et particulièrement à celle de la forme millimolaire.

La cellule disposerait de certaines protéines activatrices qui augmenteraient la sensibilité des protéases aux ions calcium, facilitant leurs activités protéolytiques. De telles protéines ont été identifiées dans les plaquettes et le cerveau bovin (Takeyama et *al.* (167)), dans les neutrophiles humains (Pontremoli et *al.* (168)) et dans les hématies humaines (Salamino et *al.* (169)).

Plus récemment, un activateur spécifique de la μ -calpaine, UK114, a été mis en évidence dans le cerveau de rat (Melloni et *al.* (170) (171)). Il permet d'augmenter le seuil de sensibilité au calcium d'un facteur 10 en formant un complexe stoechiométrique avec la μ -calpaine. De la même façon, dans le muscle squelettique de rat, l'acétyl-coA-binding-protein (l'ACBP) forme un complexe spécifique avec la m-calpaine au niveau membranaire (Pontremoli et *al.* (172), Melloni et *al.* (173)) et divise par 50 l'exigence en calcium de la m-calpaine.

III.5 Distribution tissulaire et localisation cellulaire des calpaines

Les **calpaines ubiquitaires** ont été détectées chez un grand nombre d'espèces animales ; les végétaux, les bactéries et les levures en seraient dépourvus. Exprimées de façon ubiquitaire, elles ont été identifiées et purifiées dans divers tissus (Thompson et *al.* (174)). La m-calpaine est retrouvée au niveau du cerveau, du foie, des reins, des muscles lisse et cardiaque, des cellules sanguines,... puis isolée et purifiée à partir de tissus musculaires de

différents vertébrés : le poulet (Ishiura et *al.* (175)), le porc (Dayton et *al.* (176)), le boeuf (Waxman et *al.* (177)), le lapin (Azanza et *al.* (178)) et l'Homme (Suzuki et *al.* (179)),...

La μ -calpaine a été mise en évidence pour la première fois dans le muscle cardiaque de chien (Mellgren (180)) puis dans le cerveau de rat (Onizuka et *al.* (181)),... elle a été isolée à partir de nombreux tissus tels que le foie de rat (Demartino et Croall (182)), les érythrocytes humains (Murakami et *al.* (183)), les plaquettes sanguines bovines (Sakon et *al.* (184)), le muscle porcin (Dayton et *al.* (185)) ou le tissu musculaire de rat (Kumamoto et *al.* (186)),...

Les niveaux d'expression des formes μ - et m-calpaines varient de façon indépendante d'un tissu à l'autre au sein d'une même espèce (Kawashima et *al.* (187)). Ainsi, chez le rat, le rein et la rate présentent une quantité de μ -calpaine abondante alors que dans le cerveau et le poumon, la forme m-calpaine est la plus représentée. Dans les érythrocytes de rat, seule la μ -calpaine est représentée (Murachi (188)). L'activité calcium-dépendante de la m-calpaine est en générale plus importante que celle de la μ -calpaine.

Les activités calpaine trouvées sont corrélées aux taux des ARNm présents dans un tissu ce qui permet d'envisager l'existence d'une régulation transcriptionnelle spécifique du tissu (Suzuki et *al.* (189), Emori et *al.* (190)).

L'absence de co-régulation de l'expression des deux isoformes dans un tissu suppose que ces peptides hydrolases contrôlent des fonctions biologiques différentes et spécifiques des tissus.

La distribution subcellulaire des calpaines ubiquitaires est spécifique du type de cellule et, dans le cas du muscle squelettique, diffère au cours du processus de différenciation. Dans les cellules A431 en interphase, les μ - et m-calpaines sont majoritairement distribuées dans le cytoplasme, leurs localisations se modifiant au cours du phénomène de mitose alors que les cellules de carcinomes cérébraux C33A présentent une abondante concentration nucléaire en μ -calpaine (Lane et *al.* (191)).

Dans le muscle squelettique, les calpaines ubiquitaires et leur inhibiteur spécifique se retrouvent majoritairement au niveau de la bande Z des myofibrilles. Les mitochondries et noyaux des cellules musculaires en seraient pourvus alors que les espaces cytoplasmiques intermyofibrillaires n'en posséderaient que de très faibles taux (Kumamoto et *al.* (192)).

Dans les cellules musculaires, la μ - calpaine est détectée dans le noyau des myoblastes et dans le cytoplasme des myotubes. La m-calpaine est uniquement présente dans le cytoplasme, concentrée près de l'enveloppe nucléaire. L'activité de la m-calpaine est élevée en prolifération (4^{ème} jour de culture), atteint un maximum au début de la fusion (8^{ème} jour) et

diminue progressivement avec le nombre de myotubes (12^{ème} jour) (Moraczewski (193)). Une extériorisation de la m-calpaine a été mise en évidence lors de la fusion des myoblastes (Brustis et *al.* (194)). L'activité de la μ -calpaine augmente régulièrement en prolifération jusqu'à un maximum lorsque les cellules se différencient. Ces profils d'activité suggèrent que les deux isoformes jouent un rôle différent lors de la fusion des cellules satellites (Moraczewski (195)).

Plusieurs substances pharmacologiques peuvent soit moduler l'expression cellulaire de ces enzymes soit modifier leur localisation intracellulaire. L'épinéphrine, par exemple, peut stimuler l'activité des μ - et m-calpaines dans les cellules musculaires en culture (Ertbjerg et *al.* (196)). Sous l'influence des esters de phorbol, les calpaines sont capables de migrer du cytoplasme vers la membrane plasmique (Pontremoli et *al.* (197)). Dans les plaquettes humaines, où la μ -calpaine prédomine fortement, la stimulation par la thrombine, l'ionomycine, le collagène ou le PMA entraîne sa translocation vers la membrane plasmique (Ariyoshi et *al.* (198)).

Au niveau du muscle squelettique, l'expression des transcrits de la **p94** est dix fois supérieure à celle des calpaines ubiquitaires (Sorimachi et *al.* (199)). Celle-ci n'est cependant pas limitée à ce tissu puisque de faibles taux d'ARNm ont été trouvés dans la langue, les yeux, le cerveau, le cristallin... Il semblerait que le gène codant pour la p94 subisse un certain nombre d'épissages alternatifs, en particulier au niveau des séquences NS, IS1, IS2 et du domaine de fixation aux ions calcium, ce qui entraînerait l'apparition de plusieurs isoformes de p94 (Herasse et *al.* (200)). La diversité des transcrits issus de ce processus serait régulée en fonction de l'espèce, du tissu, mais aussi au cours du développement embryonnaire (Herasse et *al.* (201), Fougrousse et *al.* (202)).

La p94 possède une demi-vie très courte (estimée à 30 minutes dans les cellules COS) qui explique la difficulté rencontrée pour identifier et purifier cette enzyme (Sorimachi et *al.* (203)).

III.6 Rôles physiologiques des calpaines et pathologies

III.6.1 Les calpaines ubiquitaires

Il est encore difficile de définir précisément le(s) rôle(s) biologique(s) de ces calpaines en raison de la diversité de leurs substrats et de leurs expressions ubiquitaires. Elles interviennent dans de nombreux mécanismes physiologiques notamment dans :

- **le cycle cellulaire** : les calpaines sont responsables de la dégradation de plusieurs facteurs participant directement au fonctionnement du cycle cellulaire notamment de la p53 (Pariat et *al.* (204)) et de la cycline D1 (Zhang et *al.* (205)). De plus, une relocalisation des calpaines durant les processus de mitose et de méiose a été observée dans différents modèles cellulaires (Lane et *al.* (206)).

- **la potentialisation à long terme** : ce phénomène est impliqué dans le processus de mémorisation et correspond à une transmission synaptique accrue résultant de stimulations à hautes fréquences. Les calpaines pourraient y jouer un rôle (Lynch et *al.* (207) (208), Vanderklis et *al.* (209)).

- **l'apoptose** : différents événements cellulaires imputés à l'action des calpaines ubiquitaires, tels que le clivage de la p53 (Pariat et *al.* (210)), font de ces enzymes des candidats potentiels à l'initiation des phénomènes de mort cellulaire programmée (Squier et Cohen (211)). Rami et *al.* (212) envisagent que les calpaines pourraient être impliquées dans la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. Cependant, quelques auteurs (Tin Chua et *al.* (213)) pensent qu'au contraire les calpaines agiraient comme des régulateurs négatifs de l'apoptose par le clivage d'une caspase, entraînant l'inactivation de celle-ci.

- **Autres** : les calpaines interviennent entre autres dans différentes voies de la transduction du signal cellulaire (Savart et *al.* (214), Inomata et *al.* (215), Rock et *al.* (216), Carragher et *al.* (217)), dans la prolifération et la différenciation cellulaires (Cottin et *al.* (218)), dans le développement embryonnaire (Emori et Saigo (219)), l'adhésion cellulaire (Carragher et *al.* (220)),...

Suite à différentes situations (concentration calcique anormale, rupture de l'équilibre calpaine/calpastatine, traumatisme,...), ces enzymes peuvent subir des dérégulations à

l'origine de pathologies parfois sévères. C'est ainsi qu'une activité aberrante des calpaines est retrouvée dans :

- les cataractes (David et *al.* (221), Andersson et *al.* (222)) ;
- les maladies neurodégénératives et notamment la maladie d'Alzheimer où l'intervention du système protéolytique neutre calcium-dépendant aurait été mis en évidence au niveau moléculaire (Maruyama et *al.* (223), Karlsson et *al.* (224)). Lors de traumatisme cérébral, les calpaines et en particulier la μ -calpaine entraîneraient une dégénérescence neuronale (Kampfl et *al.* (225), Schumacher et *al.* (226)) ;
- les dystrophies musculaires (Hussain et *al.* (227), Ueyama et *al.* (228), Tidball et *al.* (229)) ;
- les ischémies cérébrales (Neumar et *al.* (230), Fukuda et *al.* (231)) et cardiaques (Yoshida et *al.* (232), Sorimachi et *al.* (233)) ;
- d'autres pathologies : maladies auto-immunes (Shields et *al.* (234)), hématologiques notamment le syndrome de Wiskott-Aldrich (Kenney et *al.* (235)),...

III.6.2 Les calpaines tissus-spécifiques

La présence de la p94 est indispensable à la structure et à la fonction du muscle squelettique. Une déficience de cette protéase entraîne une désorganisation de la structure myofibrillaire ainsi qu'une disparition des contractions spontanées des myotubes (Poussard et *al.* (236)).

Richard et *al.* (237) (238) ont identifié le gène responsable d'une maladie autosomique récessive, la dystrophie des ceintures ou LGMD2A (Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2A) comme étant celui codant pour la calpaine 3. Cette myopathie est caractérisée par une atrophie des muscles des ceintures pelvienne et scapulaire, une élévation de la concentration sérique en créatine kinase et un aspect de nécrose-régénération sur les biopsies musculaires humaines ; elle serait causée par une perte d'activité de la p94 au niveau du muscle.

IV – LA VOIE DES CASPASES

Les caspases sont des protéases à cystéines ; leurs noms proviennent des résidus cystéines conservés dans le site actif et de la présence d'un résidu aspartate dans le site consensus de clivage des substrats (*cysteine-dependent aspartate-directed proteases*).

Grâce à la présence d'une séquence pentapeptidique QACR(N/Q)G conservée dans le site actif des caspases, 15 isoformes ont pu être dénombrées à ce jour chez les mammifères (Nicholson et Thornberry (239)), (Figure 9).

La famille des caspases a pu être divisée en trois groupes sur la base de leurs activités et de la taille de leur pro-domaine (Stennicke et Salvesan (240)) :

- les caspases-1, -4, -5, -11-14 qui sont impliquées dans la médiation de la réponse inflammatoire (Kuida et al. (241), Li et al. (242), Wang et al. (243)) ;

- les caspases-2, -8-10 dites caspases initiatrices de l'apoptose et caractérisées par un long pro-domaine ;

- les caspases-3, -6 et -7 qui sont considérées comme des caspases effectrices de l'apoptose et possèdent un pro-domaine beaucoup plus court.

Les protéases des groupes 2 et 3 interviennent à divers stades du programme apoptotique.

Elles participent à des événements précoces comme la fragmentation de l'ADN mais aussi à des phénomènes plus tardifs tels la destruction des membranes et du cytosquelette *via* la protéolyse des protéines structurales.

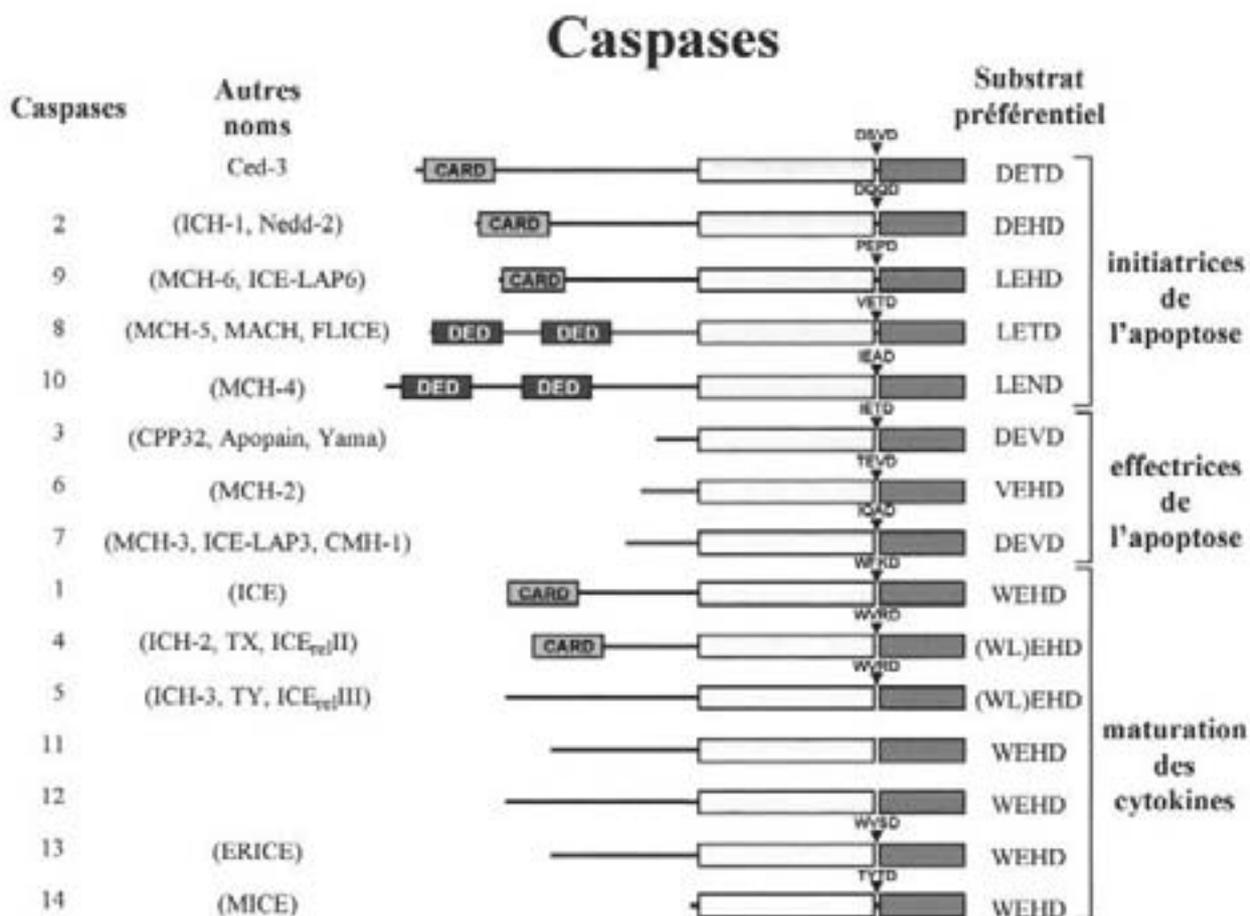


Figure 9 : La famille des caspases : leurs noms, leurs structures, leurs sites de clivage préférentiels, leurs groupes (d'après Strasser et al. (244)).

Toutes ces protéases sont constitutivement présentes dans la cellule sous forme de précurseurs, zymogènes inactifs ou encore pro-caspases dont les pro-domaines N-terminaux sont de tailles variables (Cryns et Yuan (245)). Ceux-ci sont suivis de deux sous-unités de 20 et 10 kDa.

L'activation de ces pro-caspases dépend de la protéolyse limitée ; la forme complètement active est un hétérotétramère composé des deux grandes et des deux petites sous-unités, identiques entre elles et résultant d'une auto-protéolyse (Walker et *al.* (246), Wilson et *al.* (247)). Plusieurs études ont montré que l'agrégation de certaines pro-caspases pouvait aboutir à leurs activations puis à leurs maturations (Martin et *al.* (248), Muzio et *al.* (249)). Cette étape nécessite la fixation de protéines adaptatrices (FADD, TRADD (Boldin et *al.* (250), Muzio et *al.* (251), Apaf-1 (Chou et *al.* (252))...) qui possèdent des motifs consensus communs ; ces protéines permettent le recrutement des pro-caspases et leurs mises en relation avec des protéines de l'apoptose (Ashkenazi et Dixit (253)), des récepteurs membranaires (CD95/Apo-1 ou TNF-R1)...

En ce qui concerne leurs substrats, les caspases sont des protéases très sélectives. Elles reconnaissent des motifs térapeptidiques et les clivent sur l'extrémité carboxyle d'un résidu aspartate. La spécificité de reconnaissance d'une caspase vis-à-vis de divers substrats est déterminée par les acides aminés situés en amont du site de clivage (Nicholson et Thornberry (254)).

Il est possible de regrouper la majorité des substrats des caspases en quatre sous-types (Cryns et Yuan (255), Thornberry et Lazebnik (256)) :

- les protéines structurales comprenant les protéines du cytosquelette telles que l'actine, la gelsoline, l' α -fodrine, la β -caténine (Steinhusen et *al.* (257)), la kératine 18 ou des protéines nucléaires telles que les lamines A et B ;

- les protéines régulatrices du génome pouvant intervenir à différents niveaux tels que le métabolisme ou la réparation de l'ADN (protéines PARP (Lazebnik et *al.* (258)), DNA-PKcs, DNA topoisomérase II, RF-C 140, RNA polymérase I, PARG (Affar et *al.* (259)), pRB, ...) ;

- les protéines impliquées dans la transduction du signal : protéines kinases C nouvelles δ , θ et μ , PKC atypique ξ , PKN, kinases calcium-calmoduline-dépendantes CaMK II et IV, FAK, MEKK, Akt-1, la phosphatase PP2A, phospholipases PIA2, PLC- γ 1, pro-interleukines-1 β , -16, -18, NF κ B et I κ B, ... ;

- les protéines directement impliquées dans le processus apoptotique : parmi elles les pro-caspases ; les substrats des caspases initiatrices sont principalement les caspases effectrices. Ainsi, la caspase-8 clive *in vitro* les pro-caspases-3, -4, -7 et -9 (Muzio et al. (260), Srinivasula et al. (261), Takahashi et al. (262)), la caspase-10 clive les pro-caspases-3, -7 et -8 (Fernandes-Alnemri et al. (263)) alors que la caspase-9 active les caspases-3 et -7 (Srinivasula et al. (264)). Certaines protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bid et Bax) et l'inhibiteur de la Dnase CAD sont également des substrats de caspases.

Compte tenu de l'importance de ces protéases dans l'homéostasie cellulaire, un niveau de régulation élevé de leur activité est nécessaire. Outre leur maturation *via* une protéolyse limitée, l'activité caspase peut être réglée au niveau transcriptionnel (c'est le cas de la pro-caspase-3 dont le taux de messagers augmente très rapidement suite à certains stimuli apoptotiques, Chen et al. (265)) ou par liaison à des protéines inhibitrices telles CrmA (*cytokine response modifier A*), p35, les IAPs (*inhibitor of apoptosis protein*) ou FLIP (*FLICE inhibitory protein ou casper*). L'action de la CrmA est plus spécifique des caspases du premier et deuxième groupe (en particulier des caspases-1, -5, -8 et -9) (Garcia-Calvo et al. (266)) donc de l'inhibition de la réponse inflammatoire mais également de l'apoptose.

La protéine p35 possède un large spectre d'activité inhibitrice vis-à-vis des caspases. Son effet inhibiteur dépend de son clivage par les caspases et de la formation d'un complexe stoechiométrique stable entre la caspase et l'un des fragments (p25) précédemment générés (de la Cruz et al. (267)).

Les protéines inhibitrices de l'apoptose IAP (telles XIAP *X-chromosome-linked IAP*, cIAP-1 et 2 *cellular IAP*, ML-IAP *melanoma cell lines IAP*, NAIP *neuronal apoptosis inhibitor*, la survivine, ...) sont les inhibiteurs endogènes les plus puissants de la mort cellulaire (Ambrossini et al. (268)). Ce potentiel passe par leur capacité à lier et ainsi inhiber les caspases initiatrices et effectrices. Leur propre régulation est particulièrement stricte.

L'inhibiteur compétitif FLIP, homologue inactif des caspases-8 et -10, (Hu et al. (269), Thome et al. (270)) bloque spécifiquement l'apoptose induite par la superfamille des récepteurs au TNF en empêchant la liaison de ces caspases avec leurs protéines adaptatrices.

D'autres protéases à cystéine, les calpaines, interviennent dans la régulation de l'expression des caspases. Ainsi le clivage des pro-caspases-3, -7 et -12 par les calpaines entraîne leurs

maturations et leurs activations (Blomgren *et al.* (271), Nakagawa et Yuan (272)) alors qu'il aboutit à l'inactivation des pro-caspases-7, -8 et -9 (Chua *et al.* (273)).

Les caspases et calpaines sont deux familles de protéases à cystéine très fréquemment impliquées dans le processus apoptotique (Pike *et al.* (274)). Il existerait une coopération dans la protéolyse d'éléments clefs de l'apoptose qui aboutirait à l'amplification du processus apoptotique et contribuerait à le rendre irréversible. Ces deux familles d'enzymes possèdent plusieurs substrats communs, chacune exerçant son action protéolytique au niveau de sites de clivage différents. Ainsi l'ADP-ribosyltransférase PARP (McGinnis *et al.* (275)), la DNA polymérase ϵ humaine (Liu et Linn (276)), certaines protéines structurales telle que l' α -spectrine (Wang (277)) ou du cytosquelette telles la vimentine et l'actine (Ando *et al.* (278)) ainsi que plusieurs kinases (kinases calcium-calmoduline-dépendantes CaMK II et IV et la FAK (Wang (279)) sont connues pour être clivées par les caspases et les calpaines.

Un autre lien entre ces deux familles de protéases repose sur la calpastatine. En effet, cet inhibiteur endogène des calpaines peut être dégradé et inactivé par les caspases (Kato *et al.* (280)) ; une dégradation de la forme HMW de la calpastatine (120 kDa) a été mise en évidence au cours de l'apoptose dans de nombreux modèles cellulaires. La protéolyse caspase-dépendante de la calpastatine a pour effet de libérer la calpaine sous une forme potentiellement activable par le calcium.

Ces deux familles de protéases à cystéine, participant au processus d'exécution de l'apoptose, sont capables d'interagir de manière directe ou indirecte. Elles possèdent en effet des substrats communs et peuvent réguler réciproquement leurs activités. Ces interactions permettent donc d'établir un dialogue entre deux voies de signalisation apoptotiques et probablement de réguler et/ou d'amplifier leurs effets (Figure 10).

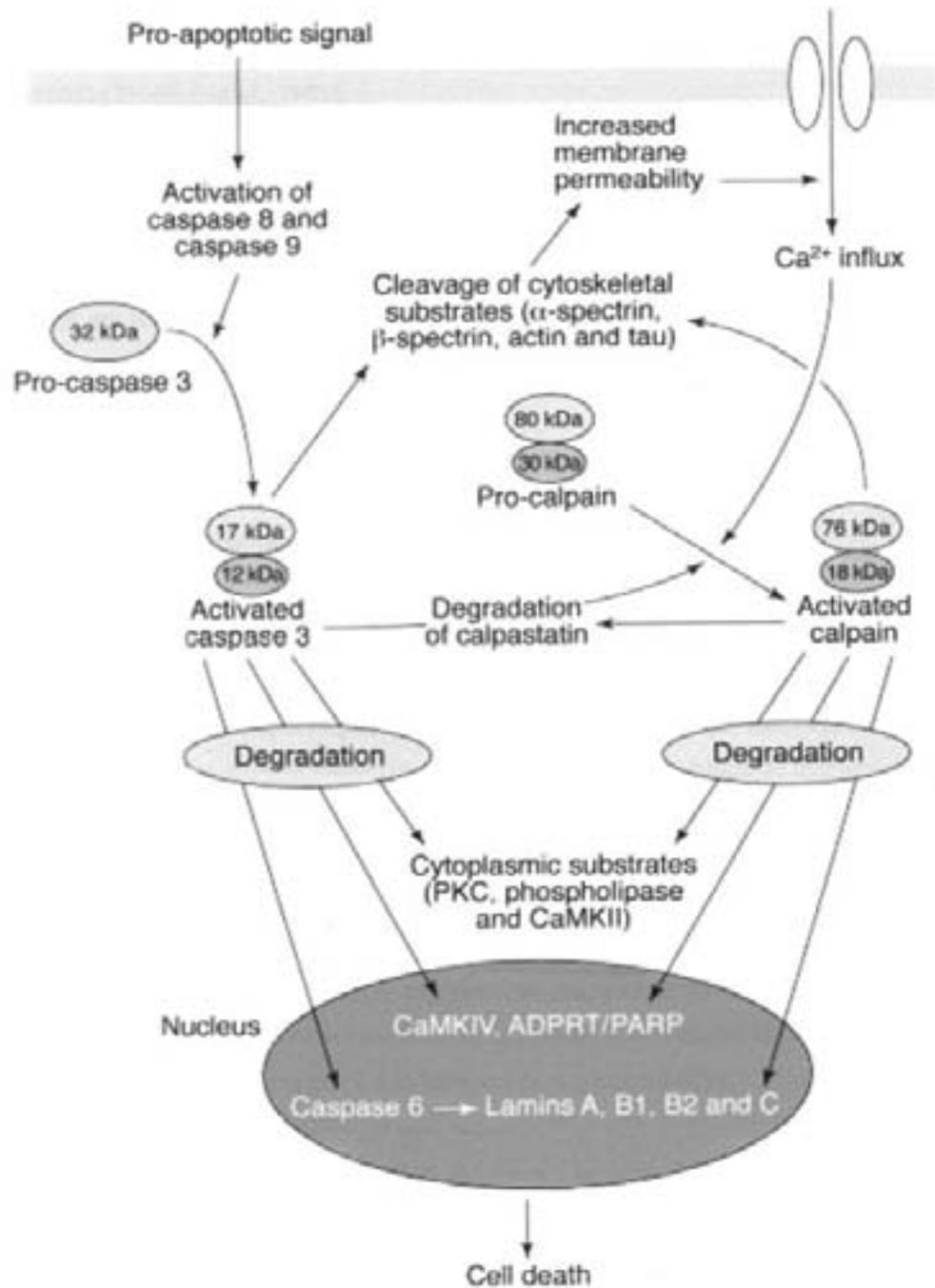


Figure 10 : Le « *cross-talk* » caspases/calpaines (d'après Wang (281)).

2^{ème} partie

LA DIFFERENCIATION DE LA CELLULE MUSCULAIRE

I – MISE EN PLACE DU PROCESSUS DE DIFFERENCIATION MUSCULAIRE

Le phénomène de différenciation myogénique est le mécanisme par lequel les myoblastes (cellules fusiformes mononucléées) fusionnent pour donner naissance à des myotubes (cellules multinucléées) qui formeront plus tard les fibres musculaires.

Ce processus de différenciation peut être reproduit en culture *in vitro* (Holtzer et *al.* (282), Lassar et *al.* (283)) à partir de myoblastes soit isolés de muscles embryonnaires ou adultes (culture primaire) soit transformés et immortalisés en lignée cellulaire. Dans les deux cas, malgré quelques différences notables, la séquence d'événements conduisant à la différenciation reste la même.

Avant de s'engager dans la fusion, les myoblastes mis en culture possèdent une activité mitotique intense. Cette prolifération est sous l'influence de facteurs de transcription spécifiques (c-Jun, c-Fos, c-Myc...) mais également dépendante d'éléments extérieurs comme la présence dans le milieu de FGF ou TGF- β qui maintiennent *in vitro* les myoblastes en prolifération (Olwin et *al.* (284)) ou la privation en sérum qui fait sortir les cellules du cycle cellulaire et les fait entrer en différenciation (Olson et *al.* (285)).

Lorsque la population cellulaire s'est fortement accrue, les myoblastes migrent pour former des agrégats et s'alignent en chaîne (Wakelam (286)), la direction de migration semblant être donnée par la fibronectine (Chiquet et *al.* (287)). *In vitro*, l'alignement cellulaire est un phénomène caractéristique qui annonce l'étape suivante de la myogenèse à savoir la fusion membranaire puis cytoplasmique des myoblastes et la formation d'un syncytium appelé myotube.

Le déclenchement de la fusion est fonction de la composition du milieu, de la densité cellulaire (Linkhart et *al.* (288)), de la reconnaissance (Breton et *al.* (289)) et de l'adhésion (Knudsen et *al.* (290)) des cellules entre elles. Ce processus calcium-dépendant implique des

modifications biochimiques à la surface des membranes. Deux molécules de surface, localisées au niveau des zones de contact membranaire des myoblastes (Megre et *al.* (291)), semblent être particulièrement impliquées dans ce processus d'adhésion : la N-CAM, dont l'action est indépendante du calcium (Knudsen et *al.* (292)) et la N-cadhérine, protéine calcium-dépendante (Pouliot et *al.* (293)). Plusieurs autres molécules comme l'intégrine VLA-4 et son récepteur VCAM-1 (Rosen et *al.* (294)) ou encore la M-cadhérine (Cifuentes-Diaz (295)) semblent également intervenir.

L'étape suivante met en jeu des interactions protéiques entre les myoblastes au niveau des "gap-junctions", éléments responsables des communications inter-cytoplasmiques (Mège et *al.* (296)). L'augmentation de fluidité membranaire favorise la fusion des bicouches phospholipidiques et contribue au mélange des cytoplasmes. Cette phase fait certainement intervenir des phénomènes protéolytiques qui permettent notamment la rupture des liens entre protéines membranaires (exemple des intégrines) et cytosquelette (Glukhova et *al.* (297)), rendant possible leur migration dans la bicouche ainsi que la dégradation de protéines nécessaires à la stabilisation des plaques d'adhésion (taline, vinculine). L'évolution ultérieure est essentiellement caractérisée par la croissance des myotubes (cellules multinucléées issues de la fusion des myoblastes), la migration des noyaux qui s'alignent au centre du myotube ainsi que l'assemblage du système sarcotubulaire et de l'appareil myofibrillaire ordonnant les myofibres puis les myofibrilles.

Les processus de fusion et de différenciation entraînent une réorganisation de la structure cytosquelettique et une redistribution de composés membranaires (Fulton et *al.* (298)). Ce remodelage cellulaire est associé à une synthèse accrue de protéines (myosine, actine, tropomyosine, troponine, récepteur à l'acétylcholine...) et à une augmentation de l'activité enzymatique spécifique du muscle (créatine phosphokinase, calpaine...).

II – REGULATION DE LA MYOGENESE

L'engagement des cellules mésodermiques dans la lignée musculaire nécessite l'activation de facteurs de transcription appelés MRFs (Myogenic Regulator Factors) : MyoD (Myoblast Determination Gene) (Davis et *al.* (299)), Myf-5 (Braun et *al.* (300)), myogénine (Wright et *al.* (301)) et MRF4 (Rhodes et Konieczny (302)). Ces protéines comportent une

région basique impliquée dans la liaison à l'ADN et un domaine en hélice-boucle-hélice (HLH) nécessaire à l'hétérodimérisation avec d'autres membres de la même famille (Benezra et *al.* (303)). Suite à leurs associations avec les protéines bHLH E12 ou E47 (Murre et *al.* (304)), les MRFs se fixent sur des séquences consensus de l'ADN (CANNTG), les E-box, présentes sur de nombreux promoteurs et "enhancers" de gènes spécifiques du muscle squelettique.

La transcription séquentielle des MRFs a pu être mise en évidence dans des lignées de myoblastes ainsi que lors du développement musculaire chez la souris (Montarras et *al.* (305), Buckingham (306)).

Avant la formation du myotome chez la souris, seul Myf-5 est exprimé. Il apparaît pendant la genèse des premiers somites dans des régions connues pour être des sites de détermination musculaire. Il semblerait donc que ce facteur de régulation soit responsable de la détermination des cellules somatiques en un lignage myogénique.

Dans le myotome, l'expression de Myf-5 est suivie de l'apparition des ARNm de la myogénine puis de MRF-4 et de MyoD. Au niveau des membres, Myf-5 est le premier facteur exprimé immédiatement suivi par MyoD, la myogénine puis MRF-4 (Sassoon et *al.* (307), Bober et *al.* (308), Buckingham (309)). Des expériences de mutations suggèrent que Myf-5 et MyoD peuvent se substituer mutuellement au cours du développement musculaire et sont nécessaires à la fois à la détermination et à la survie des myoblastes (Braun et *al.* (310), Rudnicki et *al.* (311)).

Les souris qui ne possèdent pas de gène fonctionnel codant pour la myogénine produisent des fibres musculaires primaires normales mais pas de fibres musculaires secondaires (Hasty et *al.* (312), Nabeshima et *al.* (313), Venuti et *al.* (314)). Ces résultats semblent donc indiquer un rôle essentiel de la myogénine au moment de la différenciation terminale des myoblastes en myotubes. Il est possible que la fonction MRF-4 puisse être compensée par l'expression de la myogénine (Zhang et *al.* (315)). Rawls et *al.* (316) suggèrent pourtant qu'aucun de ces gènes n'est absolument nécessaire dans la différenciation des myoblastes, chacun des facteurs myogéniques bHLH semblant être capable d'activer le programme de différenciation musculaire dans des conditions appropriées.

Les doubles mutants MRF-4/MyoD montrent une déficience musculaire sévère, similaire à celle observée chez les souris nulles pour la myogénine, une simple mutation de l'un ou de l'autre de ces facteurs n'ayant que peu d'effet sur la myogenèse. Il apparaît alors clairement que la myogénine, présente chez les doubles mutants MRF-4/MyoD, ne peut assurer à elle

seule une différenciation musculaire normale. Dedieu et *al.* (317) montrent que l'inhibition de MyoD, Myf-5 et myogénine par traitement des myoblastes C2C12 avec des antisens empêche la fusion de ces cellules et que chacun de ces facteurs de transcription régule des gènes distincts lors de ce processus.

L'activation des gènes pendant la différenciation musculaire fait également intervenir des facteurs de transcription de la famille MEF2 (Myogenic Enhancer Factor 2) (Olson et *al.* (318)). Ces protéines se lient sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère à des séquences consensus de l'ADN riches en AT présentes dans les régions régulatrices de la plupart des gènes spécifiques du muscle dont celui de la myogénine. Ces facteurs MEF2 régulent l'expression des MRFs et stabilisent l'ancrage des hétérodimères MRF/E12 sur l'ADN (Molkentin et *al.* (319)).

D'autre part, il a été montré que les IGFs étaient capables de stimuler la différenciation musculaire en culture *in vitro* (Pinset et Whalen (320), Quinn et *al.* (321), Ewton et *al.* (322), Montarras et *al.* (323), Stewart et *al.* (324)) et sont nécessaires à un développement musculaire normal pendant l'embryogenèse (Powell-Braxton et *al.* (325)). Un contrôle positif mutuel entre IGF II et MyoD a été suggéré (Montarras et *al.* (326)) et il apparaît que MyoD et IGF I sont capables d'induire l'expression de la myogénine et de ses messagers (Montarras et *al.* (327)).

La cellule musculaire possède en outre des facteurs de régulation négatifs de la myogenèse. C'est notamment le cas des protéines Id (Inhibitor of DNA Binding) qui s'associent avec les produits de la famille E2 (Lassar et *al.* (328)). Cette compétition pour la formation d'hétérodimères avec les MRFs réduit la quantité de ces facteurs capables de se fixer sur l'ADN (Benezra et *al.* (329)). Les protéines bHLH *twist* (Hebrok et *al.* (330)) et Mist1 ainsi que I-mfa (inhibitor of MyoD family) et ZEB (zinc-finger/E-box binding) semblent elles aussi inhiber l'activité des MRFs (Chen et *al.* (331), Postigo et Dean (332), Lemercier et *al.* (333)).

Les différentes étapes du développement du muscle squelettique impliquent la coopération de plusieurs facteurs de transcription, spécifiques du muscle ou ubiquitaires, dont l'action est modulée par l'intervention de régulateurs positifs ou négatifs de différentes natures (Figure 11).

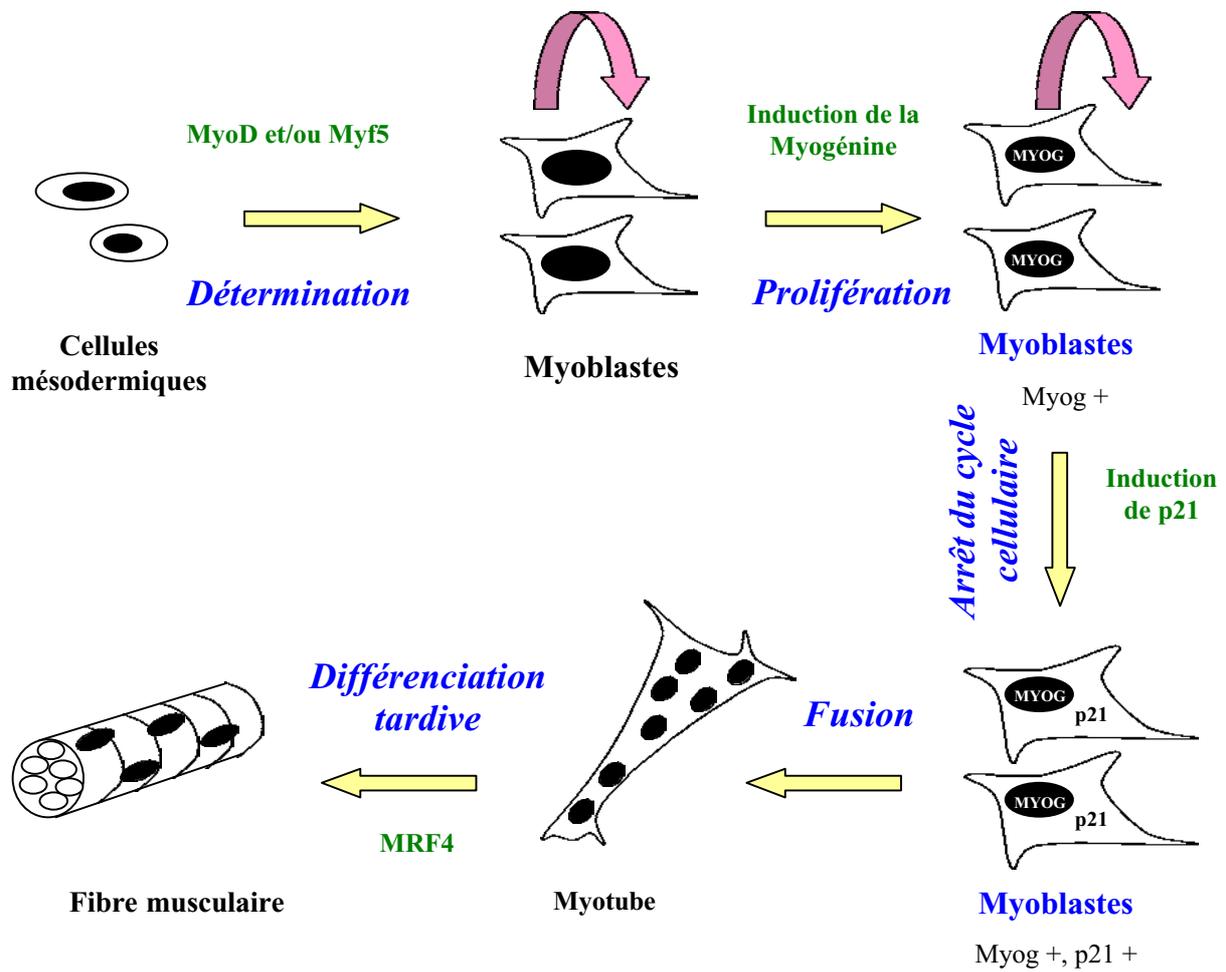


Figure 11 : *Principaux événements et facteurs régulateurs impliqués dans le développement musculaire* (d'après Ludolph et Konieczny (334) et Walsh et Perlman (335)).

3^{ème} partie

LE SYSTEME PROTEOLYTIQUE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT ET LA DIFFERENCIATION DE LA CELLULE MUSCULAIRE

Les études de Schollmeyer (336) (337) en 1986 ont permis, pour la première fois, d'impliquer les calpaines dans la myogenèse précoce et plus particulièrement au cours de la fusion des myoblastes. Au cours de ce processus, la μ -calpaine reste localisée dans le cytoplasme alors que la m-calpaine, dont la répartition est diffuse dans les myoblastes en prolifération, devient essentiellement périphérique, associée à la membrane plasmique, dans les myoblastes préfusionnels. L'activité de la m-calpaine est élevée pendant la phase de prolifération et atteint un maximum au début de la fusion puis décroît doucement avec l'augmentation du nombre de myotubes. L'activité de la μ -calpaine s'accroît régulièrement avec la croissance des cellules, le maximum étant atteint lorsque les cellules se différencient. L'activité des μ - et m-calpaines augmente de 4,9 et 1,7 fois lors de la différenciation des cellules L6 (Ebisui et al. (338)).

D'autres travaux, y compris certains réalisés au laboratoire ont confirmé ces résultats. En culture primaire de myoblastes de rat, une apparition séquentielle des ARNm, protéines et activités des μ - et m-calpaines a été observée. Ainsi, les ARNm de la m-calpaine et la protéase sont présents lors des stades précoces de la différenciation musculaire, son activité augmentant parallèlement à la fusion des myoblastes (Kwak et al. (339)). En ce qui concerne la μ -calpaine, ses messagers apparaissent après l'initiation de la fusion alors que la protéine et son activité ne sont détectées que dans les stades de différenciation "post-fusionnels", plus tardifs (Poussard et al. (340), Cottin et al. (341), Stockholm et al. (342)) (Figure 12).

Ces profils d'expression et leurs distributions subcellulaires différentes suggèrent que les μ - et m-calpaines jouent des rôles biologiques différents au cours de la myogenèse, respectivement dans l'initiation de la fusion des cellules satellites et lors des stades terminaux de la différenciation (myofibrillogenèse).

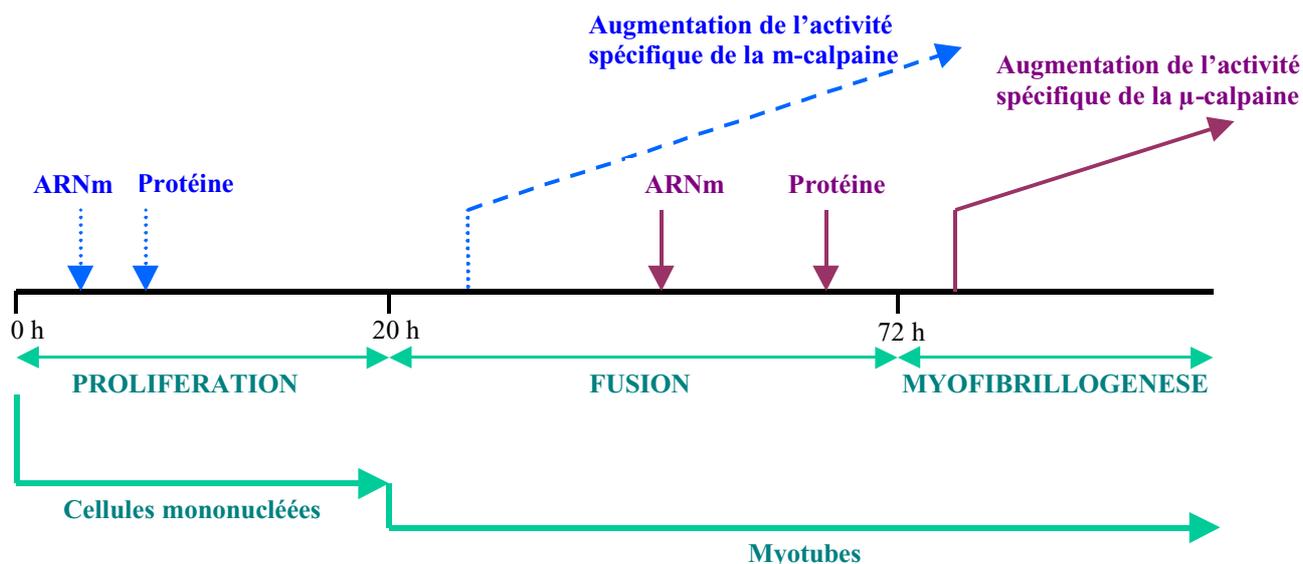


Figure 12 : *Séquence d'apparition des ARNm et protéines des μ - et m -calpaines au cours de la différenciation musculaire sur des cultures primaires de myoblastes de rat.*

Ces calpaines participent activement au processus de différenciation de la cellule musculaire. Balcerzak et *al.* (343) ont réussi à inhiber ce phénomène par un traitement antisens contre la m -calpaine. D'autre part, de nombreuses modifications à la surface des cellules myoblastiques ont été observées au moment de la fusion (Fulton et *al.* (344)) et Dourdin et *al.* (345) ont montré que la m -calpaine, de part son externalisation, était responsable du clivage du complexe fibronectine-intégrine indispensable à l'amorçage du phénomène. Des réorganisations importantes du cytosquelette ont lieu à ce moment notamment des dégradations de protéines telles la taline et la desmine (Elamrani et *al.* (346), Dourdin et *al.* (347)).

La m -calpaine subirait une régulation serrée lors du phénomène de différenciation : Dedieu et *al.* (348) suggèrent que la myogénine, en se fixant sur les séquences E-box présentes dans la région 5' de la protéase régulerait son activité au cours de ce processus.

Barnoy et *al.* (349) prônent le rôle fondamental de la calpastatine dans les processus de fusion et de différenciation des myoblastes. Leurs études s'accordent à montrer que la dégradation d'un certain nombre de protéines membranaires par les calpaines ubiquitaires est un prérequis nécessaire à la fusion mais que cette dernière reste sous la dépendance du ratio calpaine/calpastatine. En effet, le taux de calpastatine diminue d'un facteur 10 au stade de

l'alignement des myoblastes, juste avant le début de la fusion pour retrouver un taux basal après la formation des myotubes c'est-à-dire à la fin du phénomène de différenciation. Sa continuelle présence aurait pour conséquence l'inhibition de la fusion des myoblastes (Barnoy et *al.* (350)). Ceci a pu être reproduit expérimentalement par micro-injection de calpastatine dans les myoblastes de la lignée C2C12 alors que la même tentative avec de la m-calpaine purifiée accroît significativement le pourcentage de fusion (Temm-Grove et *al.* (351)). La régulation de l'expression de la calpastatine affecte ses ARNm et protéines (Balcerzak et *al.* (352)). Ce ne serait que la diminution d'expression de la calpastatine qui permettrait aux activités calpaines de s'exprimer, le taux d'ARNm et protéines des μ - et m-calpaines n'augmentant que très légèrement au cours de ces phases (Barnoy et *al.* (353)).

OBJECTIFS

L'objectif majeur de cette étude consiste à mieux appréhender le rôle biologique de la μ -calpaine au cours de la différenciation de la cellule musculaire. Cette protéase calcium-dépendante semble fortement impliquée dans ce processus où les deux formes ubiquitaires, les μ - et m-calpaines, apparaissent de façon alternée et sont localisées à des endroits différents. Plus particulièrement, la discrimination de son mode d'action dans la fusion par rapport à celui de la m-calpaine et ce notamment par la recherche de substrats spécifiques nous permettrait de comprendre les effets de sa dérégulation chez les patients atteints de certaines formes de dystrophies musculaires.

C'est donc dans cette optique que nous avons décidé de réaliser une lignée musculaire dans laquelle le niveau d'expression de la μ -calpaine pourrait être augmenté et ainsi reproduire *in vitro* les circonstances pathologiques rencontrées chez les personnes atteintes par ce type d'affection. Nous avons donc utilisé un système d'expression eucaryote nous permettant de surexprimer de façon inductible, c'est-à-dire maîtrisée, cette enzyme. Les répercussions de cette variation quantitative de la protéase dans les cellules myogéniques seront suivies aux niveaux structural et moléculaire.

En conclusion, l'obtention d'une telle lignée musculaire constitue un outil clef pour l'étude des relations existant entre la μ -calpaine et son environnement cellulaire. Cependant, le travail rapporté dans ce manuscrit représente seulement les prémices de l'utilisation de cette stratégie expérimentale. En effet, la lignée de myoblastes de souris (C2C12) étant un nouveau modèle cellulaire au laboratoire, un état des lieux précis a dû tout d'abord être effectué. De plus, la mise en place du système inductible dans les cellules myogéniques a constitué un travail considérable qui a occupé la plus grande partie du temps imparti pour cette thèse.

MATERIEL ET METHODES

I – CULTURE CELLULAIRE

La lignée cellulaire C2C12, élaborée par Blau et *al.* (354), a été utilisée comme modèle biologique pour notre étude. Elle est issue d'une lignée de myoblastes de souris adulte C3H établie par Yaffe et Saxel (355) en 1977.

Cette lignée possède une fusion relativement rapide conduisant à des myotubes exprimant l'ensemble des protéines spécifiques du muscle et qui ont la propriété de se contracter spontanément. Ceci rend la lignée C2C12 particulièrement propre à l'étude de la myogenèse et la différenciation cellulaire *in vitro*.

I.1 Prolifération cellulaire

Les myoblastes sont mis en culture dans un milieu de prolifération constitué de DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium) riche en glucose (4,5 g/l) (1 litre d'eau Volvic contenant du DMEM (GIBCO-BRL) 12 g/l, du pyruvate de sodium (SIGMA) 0,1 g/l, des acides aminés non essentiels 100 X (GIBCO-BRL) 10 ml/l, de la gentamycine (GIBCO-BRL) 50 mg/l et du NaHCO₃ (SIGMA) 3,33 g/l, pH 7,6, stérilisation par filtration sur membrane MILLIPORE 0,2 µm) additionné de 10% de sérum de veau foetal (GIBCO-BRL). Ils sontensemencés dans des boîtes (FALCON, Ø 35, 60 ou 100 mm) à une densité de 2000 cellules par cm² et sont incubés à 37 °C dans une atmosphère saturée en humidité et enrichie en CO₂ (10%). Le milieu de culture est renouvelé tous les trois jours.

Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, elles sont trypsinées pour être soit réensemencées soit congelées dans un milieu contenant 50% de DMEM, 40% de sérum de veau foetal et 10% de DMSO puis conservées en vapeurs d'azote liquide.

I.2 Différenciation cellulaire

Les cellules sontensemencées à une densité de 2000 cellules par cm² dans des boîtes préalablement traitées avec de la gélatine (1% (p/v)). Quand les myoblastes ont atteint environ 80% de confluence, le milieu de prolifération est remplacé par un milieu de différenciation

composé de DMEM additionné de 2% de sérum de cheval (GIBCO-BRL). Le milieu est changé tous les trois jours.

I.3 Quantification de la fusion des myoblastes

La fusion des myoblastes peut être exprimée par une courbe exprimant le pourcentage de fusion en fonction du temps. Différentes étapes sont nécessaires à l'établissement de cette courbe de fusion.

I.3.1 Fixation et coloration des cellules

A différents temps de culture, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% (p/v) pendant 15 min après avoir été rincées deux fois avec du PBS (NaCl 0,137 M ; KCl 2,68 M ; Na₂HPO₄ 4 mM et KH₂PO₄ 1,76 mM (SIGMA)). Après deux nouveaux rinçages, les cellules sont conservées 12 heures à 4°C dans de l'éthanol 70%.

L'évolution des cultures est suivie par coloration des noyaux à l'hémalum de Hansen (hématoxyline 10 mM, alun de potassium 260 mM et KMnO₄ 4 mM) (Balcerzak et al. (356)). Après fixation, les cellules sont rincées à l'eau distillée et incubées 8 min en présence du colorant. Après trois nouveaux lavages à l'eau distillée, les cellules sont montées sous lamelle de verre dans du PBS additionné de glycérol (10% (v/v)).

I.3.2 Evaluation du pourcentage de fusion

Les noyaux présents dans les myoblastes et les myotubes (contenant au minimum trois noyaux) sont dénombrés à l'aide d'un microscope inversé (grossissement x200). Ce comptage donne accès au pourcentage de fusion défini par le rapport :

$$\text{Fusion (\%)} = \frac{\text{Nombre de noyaux présents dans les myotubes}}{\text{Nombre de noyaux totaux (myotubes + myoblastes)}} \times 100$$

Pour chaque stade de différenciation, le pourcentage de fusion est établi par l'analyse de deux boîtes provenant de trois cultures différentes. Douze champs, choisis de façon arbitraire, sont comptés pour chaque boîte, ce qui représente une surface d'environ 6 mm² et un nombre total d'environ 3000 noyaux.

I.4 Préparation des cellules en vue de leurs observations en microscopie électronique

A différents temps de culture, les cellules sont fixées pendant 2 heures, à température ambiante, dans du glutaraldéhyde 2,5% placé dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M, pH 7,5 contenant 2 µM de CaCl₂, 2% de polyvinylpyrrolidone et 0,15 M de saccharose. Après plusieurs lavages dans ce dernier tampon, les cellules sont post fixées 2 heures dans de l'OsO₄ 1% en tampon cacodylate de sodium 0,1 M puis de nouveau rincées et traitées 30 minutes dans de l'acétate d'uranyle 1% aqueuse. Suite à leur rinçage à l'eau distillée et leur déshydratation par passages successifs dans de l'alcool à 70, 95 puis 100°, les cellules sont imprégnées et incluses dans de l'Epon. Une fois polymérisés, les blocs sont réorientés de sorte à obtenir des coupes tangentielles, obliques. Celles-ci peuvent alors être observées sous un microscope électronique (Philips M300).

I.5 Transfection des cellules eucaryotes

Les cellules C2C12 sont transfectées de façon stable avec les vecteurs des systèmes inductibles LacSwitch II et Tet-Regulated Expression System ; leurs ADN doivent s'intégrer de façon stable dans le génome des cellules eucaryotes.

I.5.1 Présentation du système LacSwitch II

Le système d'expression eucaryote LacSwitch II (STRATAGENE) est composé de deux vecteurs (répresseur : pCMVLacI / opérateur : pOPRSVI/MCS) dont le fonctionnement est basé sur celui de l'opéron lactose d'*Escherichia coli* (Fieck et *al.* (357)), (Figure 13).

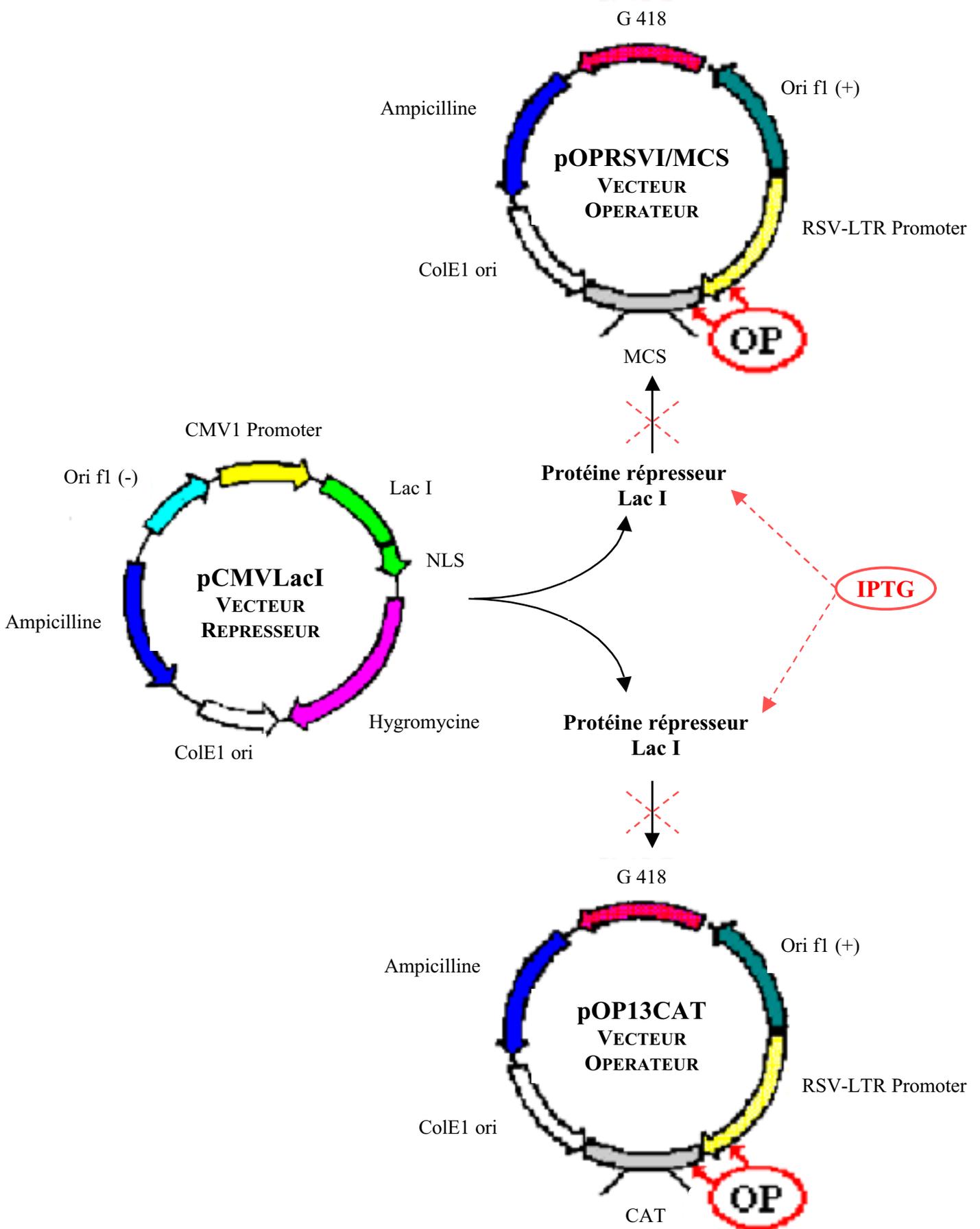


Figure 13 : Schéma de fonctionnement du système LacSwitch II (STRATAGENE)

Le vecteur pCMVLacI code de façon constitutive pour une protéine répresseur Lac I qui possède une forte affinité pour des séquences situées dans le promoteur du second vecteur pOPRSVI/MCS. Sa fixation sous forme d'homodimère sur ces sites inhibe la transcription de tout ADN exogène inséré dans le site multiple de clonage du vecteur pOPRSVI/MCS. L'association de la protéine Lac I à l'IPTG (iso-propyl-thio-galactoside), β -galactoside synthétique non hydrolysable et non toxique pour la cellule (Wyborski et Short (358)), ajouté au milieu entraîne un changement allostérique de la protéine diminuant son affinité pour les séquences opératrices du vecteur pOPRSVI/MCS. La transcription peut alors se dérouler normalement et être induite à volonté.

Un second vecteur opérateur, le vecteur pOP13CAT, est également commercialisé dans ce système ; il sera utilisé pour tester l'activité répressive du vecteur pCMVLacI (cf. paragraphe IV.3).

1.5.2 Présentation du système Tet-Regulated Expression System

Le Tet-Regulated Expression System, développé par Gossen et Bujard (359) puis modifié par Shockett (360), est également un système d'expression inductible.

Il comporte trois vecteurs (Figure 14). Le pTet-Splice dans lequel un gène cible, cloné à l'intérieur du site multiple de clonage, est placé sous le contrôle de la séquence régulatrice tetO (promoteur Tetp) de l'opéron Tn10 qui code pour la résistance à la tétracycline. Le pTet-tTAk contient le gène transactivateur de la tétracycline (tTA) sous le contrôle du promoteur Tetp. Le pUHC13-3 est un plasmide de contrôle, fonctionnant sur le même principe que le pTet-Splice et contenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur Tetp.

Lorsque la protéine tTA se fixe sur la séquence tetO, la transcription du gène cible est activée. En présence de tétracycline, tTA subit des modifications conformationnelles qui empêchent sa fixation sur cette séquence ; le gène cible, placé sous son contrôle, reste alors silencieux. La suppression de l'antibiotique reverse ce processus et active le gène cible. Les plasmides sont donc co-transfectés dans les cellules en présence de tétracycline. L'expression est induite lorsque l'antibiotique est retiré du milieu de culture (Figure 15).

Un analogue plus stable que la tétracycline a été utilisé pour l'induction de ce système : il s'agit de la doxycycline.

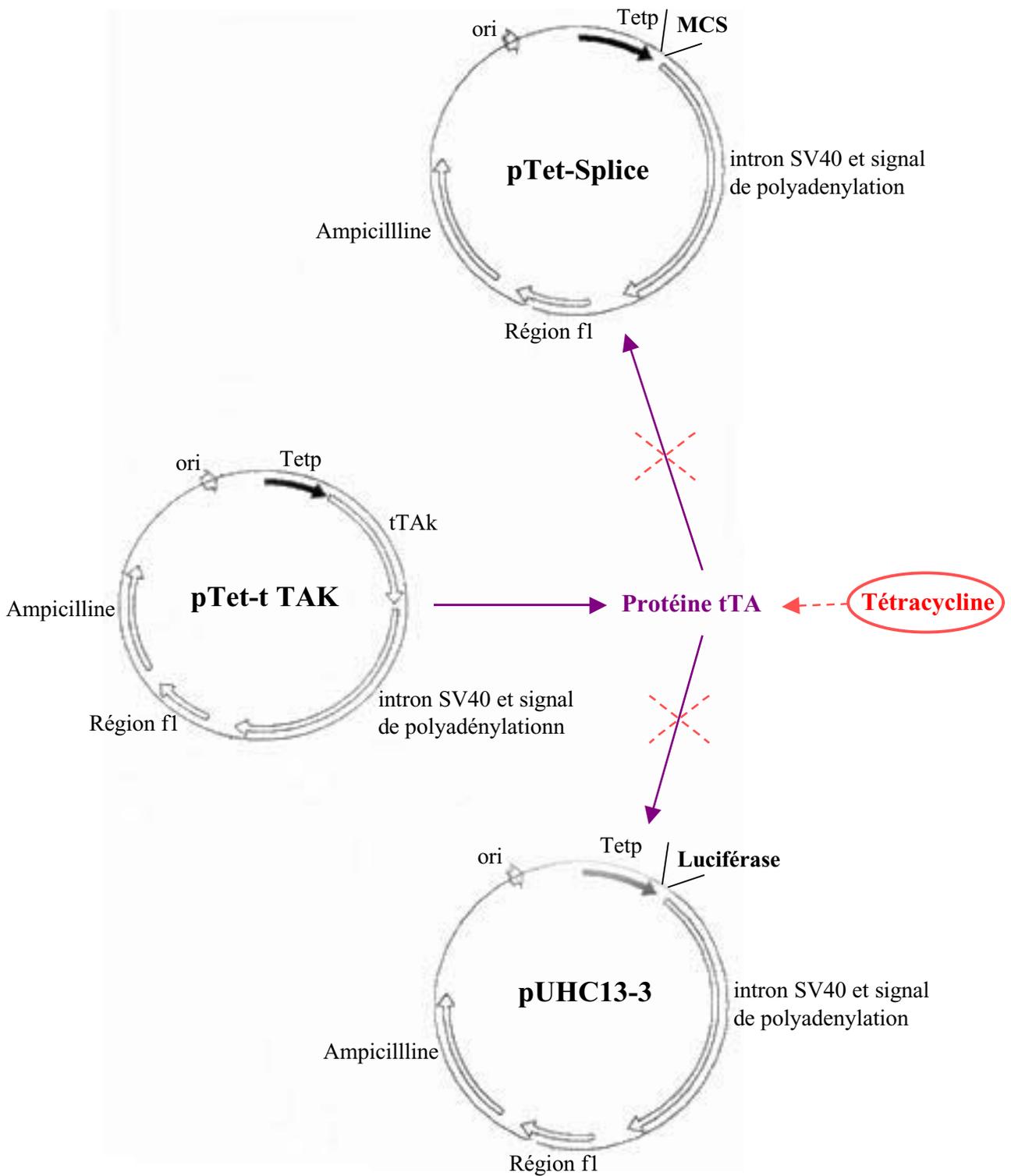


Figure 14 : Vecteurs du système Tet-Regulated-Expression System (GIBCO-BRL)

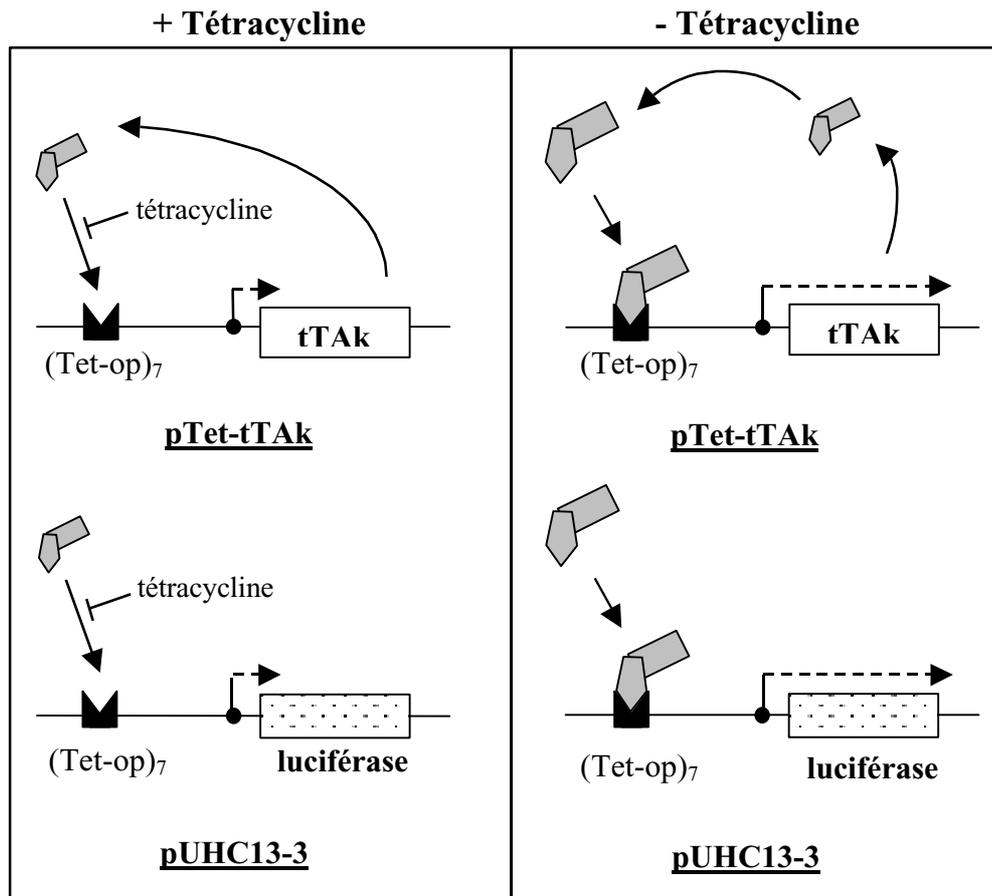


Figure 15 : *Principe de fonctionnement du Tet-Regulated Expression System (GIBCO-BRL)*
(Shockett et al. (361)).

1.5.3 Transfection de la lignée C2C12

La méthode utilisée est celle décrite par Graham et Van Der Eb (362) dans laquelle la pénétration de l'ADN dans les cellules est facilitée par la formation d'un co-précipité phosphate de calcium/ADN.

Les myoblastes sontensemencés à une densité de 10^5 cellules/cm² dans des boîtes de 60 mm de diamètre (FALCON) puis incubés 24 heures à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (10%) et saturée en humidité. Trois heures avant la transfection, le milieu de prolifération est changé. Le précipité est formé par mélange de l'ADN (5 à 10 µg) avec 31 µl de CaCl₂ 2 M filtré, ajustement du volume à 250 µl avec de l'eau stérile et ajout de 250 µl d'HBS 2X (HEPES 50 mM pH 7,1, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM) filtré. Le mélange est

mis sous bullage à plusieurs reprises et laissé 30 min à température ambiante avant d'être déposé sur les cellules. Le milieu de culture est renouvelé 12 heures plus tard.

I.5.4 Sélection des cellules transfectées

I.5.4.1 Système LacSwitch II

Chacun des vecteurs utilisés pour la transfection stable possède un gène de résistance à un antibiotique, l'hygromycine (vecteur pCMVLacI) ou la généticine, G418 (vecteur pOPRSVI/MCS). La sélection des clones qui ont intégré de façon stable le(s) vecteur(s) du système LacSwitch II se fait 48h après la transfection par addition dans le milieu de prolifération de(s) l'antibiotique(s) à la dose létale. Le milieu de culture est changé tous les trois jours jusqu'à ce que des cellules résistantes soient mises en évidence et prolifèrent. Les clones sont alors prélevés et mis individuellement à proliférer.

La dose d'antibiotique capable d'éliminer toutes les cellules n'ayant pas intégré un plasmide est déterminée sur les cellules sauvages en prolifération (ensemencement à une densité de 2.10^4 cellules/cm²) par ajout d'une gamme de concentration en antibiotique dans le milieu de culture. La dose létale est la plus faible provoquant la mort de toutes les cellules.

Les cellules transfectées par le vecteur pOP13CAT le sont transitoirement ; elles ne subissent donc pas cette pression de sélection.

I.5.4.2 Système Tet-Regulated Expression System

Les vecteurs de ce système (pTet-tTak, pTet-Splice ou pUHC13-3) ne possèdent pas de gène de résistance à un antibiotique qui permettrait d'exercer une pression de sélection sur les cellules et ainsi d'isoler les clones qui les ont intégrés de façon stable. Un vecteur possédant un tel gène (le pcDNA3.1/Hygro, INVITROGEN) a donc été co-transfecté avec eux. Statistiquement, la probabilité d'intégration de ce dernier plasmide dans le génome des cellules transfectées est identique à celle des deux autres vecteurs ; les clones résistants à l'hygromycine ont donc également intégré les vecteurs pTet-tTak et pTet-Splice ou pUHC13-3. Un rapport de 10 :1 a de plus été utilisé.

Vingt quatre heures après la transfection, de l'hygromycine à la dose létale est ajoutée au milieu de prolifération qui contient déjà de la doxycycline (0,5 µg/ml). Le milieu de culture

est changé tous les deux jours jusqu'à ce que des cellules résistantes soient mises en évidence et prolifèrent. Les clones sont alors prélevés et mis individuellement à proliférer.

II - CONSTRUCTION DES PLASMIDES RECOMBINANTS POPRSVI/MCS - μ -CALPAINE ET pTET-SPLICE - μ -CALPAINE

L'ADNc codant pour la sous-unité catalytique de la μ -calpaine humaine nous a été donné par le Professeur Sorimachi, Department of Molecular Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan. Cet ADNc a été cloné dans le vecteur PUC-8 au niveau du site de restriction *EcoR* I.

La carte génomique de la sous-unité catalytique de la μ -calpaine humaine est présentée dans les annexes de ce manuscrit.

Nous avons donc été amenés à sortir cet insert de ce vecteur pour construire le vecteur pTet-Splice - μ -calpaine (Figure 16) et pOPRSVI/MCS - μ -calpaine (Figure 17).

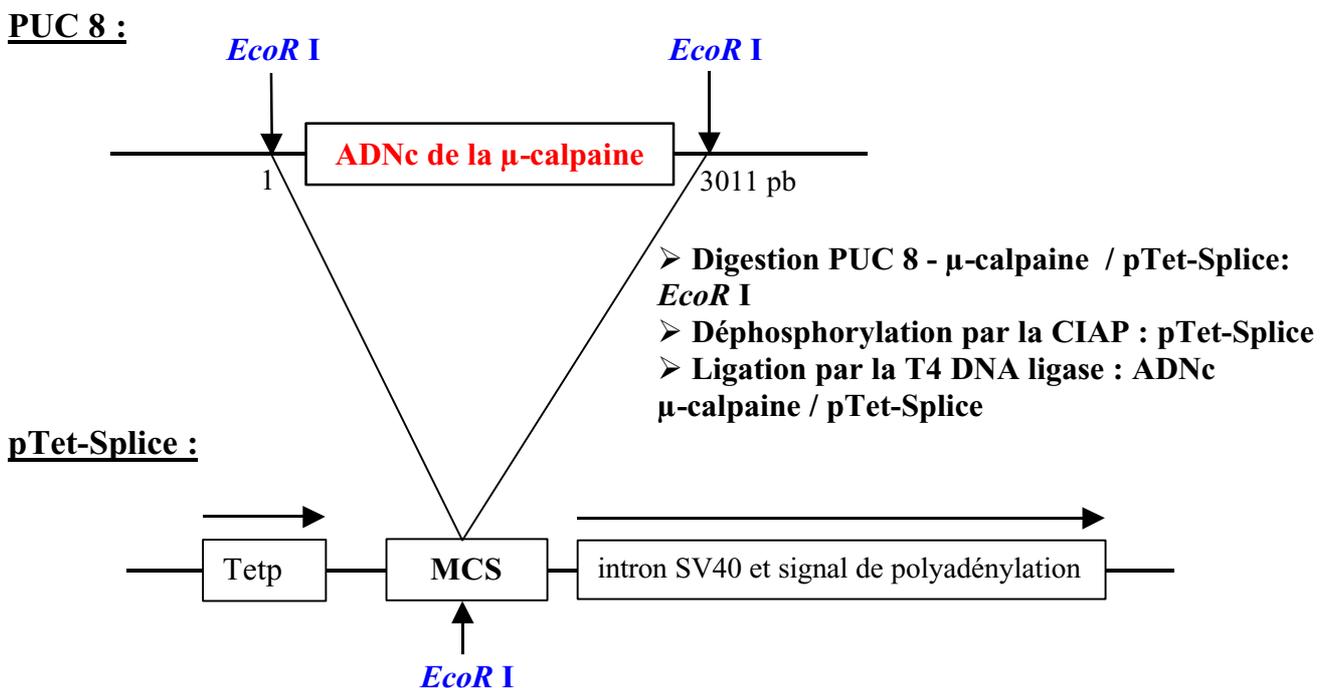


Figure 16 : *Construction du plasmide recombinant pTet-Splice - μ -calpaine*

MCS : site multiple de clonage

CIAP : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

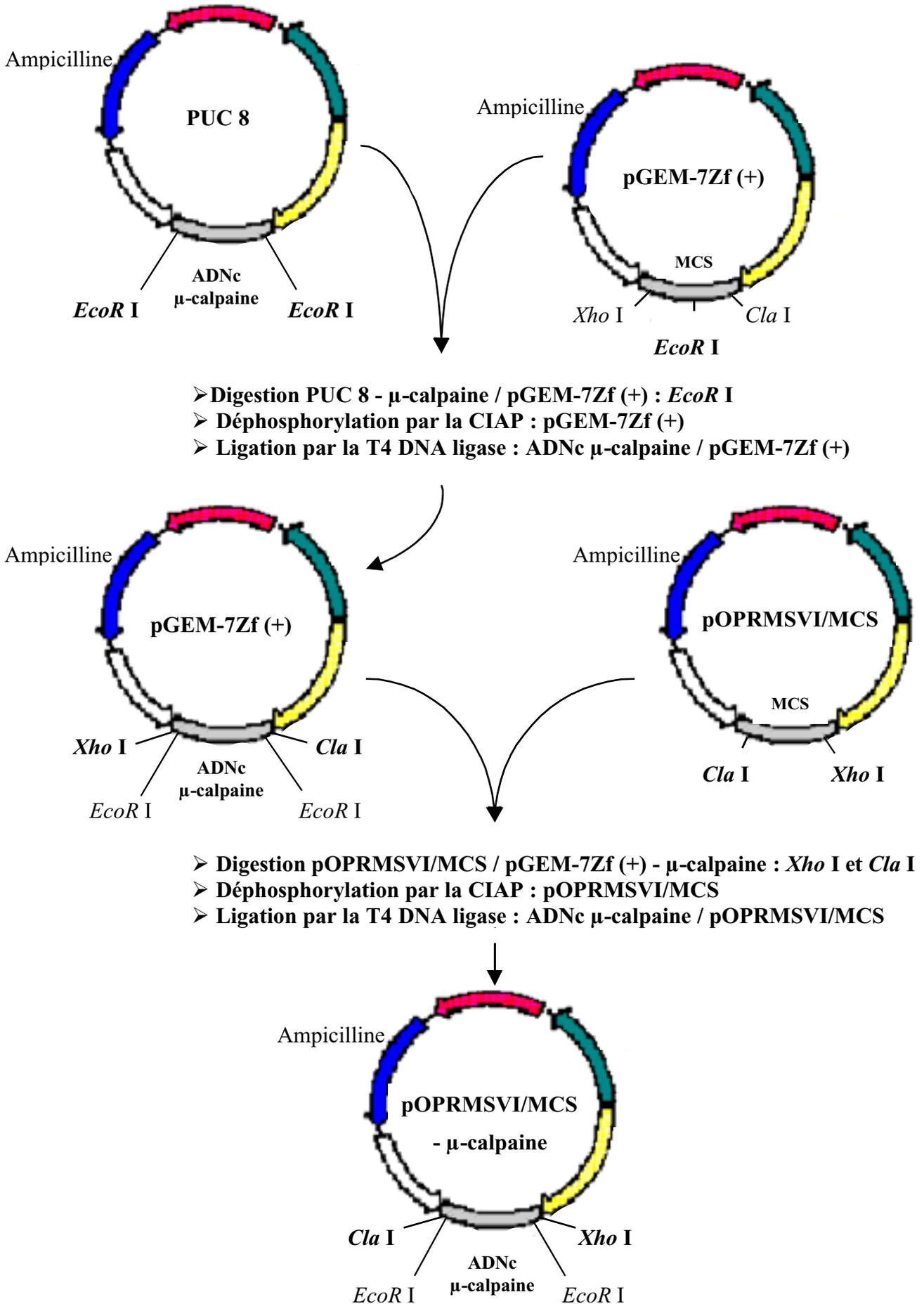


Figure 17 : Construction du plasmide recombinant *pOPRMSVI/MCS - μ-calpain*

MCS : site multiple de clonage

CIAP : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase

II.1 Digestion enzymatique

L'ADN est incubé en présence de quantités adéquates d'endonucléases de restriction et de tampon de réaction sachant qu'une unité d'enzyme est nécessaire à la digestion de 1 µg d'ADN par site et par heure. La digestion est effectuée à une température optimale pour chaque enzyme dans un volume réactionnel final de 20 µl.

Ces digestions enzymatiques permettront d'insérer un ADN exogène (ADNc de la μ -calpaine) à l'intérieur d'un vecteur mais aussi de vérifier cette intégration (carte de restriction).

Les caractéristiques des enzymes de restriction utilisées sont résumées dans le tableau II.

Enzymes	Température de réaction (°C)	Tampon de réaction	Site de coupure
<i>Apa I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 6 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 6 mM, NaCl 6 mM, DTT 1 mM.	5'-GGGCC/C-3'
<i>Bgl I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 6 mM, pH 7,9, MgCl ₂ 6 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM.	5'-GCCNN NN/NGGC-3'
<i>Cla I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, NaCl 50 mM, MgCl ₂ 10 mM, DTT 1 mM.	5'-AT/CGAT-3'
<i>EcoR I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 90 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 10 mM, NaCl 50 mM.	5'-G/AATTC-3'
<i>Hae III</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, MgCl ₂ 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM.	5'-GG/CC-3'
<i>Kpn I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 7 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM.	5'-GGTAC/C-3'
<i>Sac II</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, MgCl ₂ 10 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM.	5'-CCGC/GG-3'
<i>Sma I</i> (PROMEGA)	25	Tris-HCl 6 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 6 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM.	5'-CCC/GGG-3'
<i>Stu I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, MgCl ₂ 7 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM.	5'-AGG/CCT-3'
<i>Xba I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 6 mM, pH 7,9, MgCl ₂ 6 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM.	5'-T/CTAGA-3'
<i>Xho I</i> (PROMEGA)	37	Tris-HCl 6 mM, pH 7,9, MgCl ₂ 6 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM.	5'-C/TCGAG-3'

Tableau II : *Caractéristiques des différentes enzymes de restriction utilisées.*

II.2 Déphosphorylation par la Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)

La CIAP agit en hydrolysant le groupe 5'-phosphate des ARN, ADN, ribo- et déoxyribonucléosides triphosphates. Elle prévient ainsi la recircularisation et religation sur eux-mêmes des plasmides linéarisés par digestion enzymatique.

5 µl d'une solution de CIAP à 0,01U/µl sont ajoutés à 10 pmol d'ADN (40µl) et 5 µl de tampon CIAP 10X (Tris-HCl 50 mM, pH 9,3, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM, spermidine 1 mM). Le mélange est alors incubé 30 min à 37°C ou 15 min à 37°C puis 15 min à 56°C pour la déphosphorylation d'extrémités 5'-protubérantes ou 5'-récessives ou franches respectivement. 5 µl de la solution de CIAP à 0,01U/µl sont de nouveau ajoutés et les incubations recommencées. La réaction est arrêtée par addition de 300 µl de tampon d'arrêt (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, SDS 0,5%) ; l'ADN est alors extrait par un volume de phénol-chloroforme puis précipité (0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M pH 5,5 et 2 volumes d'éthanol absolu).

II.3 Ligation par la T4 DNA ligase

La T4 DNA ligase permet l'assemblage de deux fragments d'ADN aux extrémités cohésives complémentaires ou franches en liant les groupes 5'-phosphate et 3'-hydroxyl des nucléotides.

Pour le clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide vecteur, les rapports molaires insert/vecteur utilisés doivent être de 1 :1, 1 :3 et/ou 3 :1. La quantité d'insert entrant dans la réaction est calculée comme suit :

$$\text{ng d'insert} = \frac{\text{ng de vecteur} \times \text{nombre kbases insert}}{\text{nombre kbases vecteur}} \times \text{rapport molaire} \frac{\text{insert}}{\text{vecteur}}$$

Les acides nucléiques sont incubés en tampon de ligation 10X (Tris-HCl 300 mM pH 7,8, MgCl₂ 100 mM, ATP 10 mM, DTT 100 mM) en présence de 2 unités de T4 DNA ligase (PROMEGA) pendant 18 h à 15°C.

II.4 Compétence et transformation de bactéries

II.4.1 Compétence

Les bactéries sont étalées sur milieu LB agar (bactotryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, bacto agar 1,5% (p/v)) puis incubées une nuit à 37°C. A partir de l'une des colonies, 5 ml de milieu LB (bactotryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM) sontensemencés et les bactéries mises à proliférer sous agitation, à 37°C jusqu'à ce que la DO, mesurée à $\lambda = 600$ nm, ait atteint 0,3. 100 ml de milieu LB sont alorsensemencés avec cette préparation et le mélange est mis à pousser jusqu'à atteindre une DO de 0,48. Les bactéries sont alors centrifugées (2500 g, 10 min, 4°C) et le culot repris dans 40 ml de Tfb1 (acétate de potassium 10 mM, RbCl₂ 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, ajustement du pH à 5,8 avec de l'acide acétique 0,2 M, stérilisation par filtration). Après une incubation de 5 min dans la glace et une nouvelle centrifugation (2500 g, 10 min, 4°C), le culot bactérien est ressuspendu dans 4 ml de Tfb2 (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl₂ 10 mM, glycérol 15% (v/v), ajustement du pH à 6,5 avec du KOH, stérilisation par filtration). Après une incubation de 15 min dans la glace, des aliquots bactériens de 200 μ l sont réalisés puis conservés à -80°C. L'ensemble de ces traitements permet de fragiliser la membrane bactérienne afin de faciliter la pénétration de l'ADN.

II.4.2 Transformation des bactéries compétentes

1 à 5 μ l (1 à 10 ng) de vecteur ou de mélange de ligation sont ajoutés à 200 μ l de bactéries compétentes. Après 30 min d'incubation dans la glace, le mélange est soumis à un choc thermique (90 secondes à 42°C). Les bactéries transformées sont alors mélangées à 800 μ l de milieu SOC (bactotryptone 2% (p/v), extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM) préchauffé à 37°C puis incubées à 37°C pendant une heure, sous agitation constante. Les bactéries sont finalement étalées sur un milieu solide (bactotryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 10 mM, MgSO₄ 10 mM, bacto agar 1,5% (p/v)) sélectif puisque contenant 100 μ g/ml d'ampicilline.

II.5 Extraction et purification des plasmides

L'extraction des plasmides consiste en une lyse alcaline des bactéries. Selon l'utilisation ultérieure des plasmides, deux techniques ont été utilisées.

II.5.1 "Miniprep"

Cette méthode a l'avantage d'être rapide et de fournir des préparations propres. Elle est principalement utilisée pour sélectionner, par restriction enzymatique, les clones positifs obtenus après ligation.

Le clone bactérien est repiqué à l'aide d'un cure dent stérile dans 5 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline ; la culture est mise à pousser une nuit à 37°C sous agitation. 3 ml de culture sont alors centrifugés (5000 g, 5 min) et le culot obtenu ressuspendu dans 100 µl d'une solution froide de tampon 1 (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8). Le mélange est brièvement vortexé puis incubé 5 min à température ambiante. 200 µl d'une solution fraîchement préparée de NaOH 0,2 N, SDS 1% (p/v) sont alors ajoutés ; le contenu du tube est mélangé par retournement puis incubé 5 min dans la glace. 150 µl d'une solution froide d'acétate de potassium pH 4,8 (60 ml d'acétate de potassium 5 M, 11,5 ml d'acide acétique glacial, 28,5 ml d'eau) sont ajoutés et l'ensemble est vortexé 10 secondes avant d'être incubé 5 min dans la glace. Après centrifugation (5000 g, 5 min, 4°C), le surnageant est prélevé et extrait par un volume de phénol-chloroforme. L'ADN plasmidique contenu dans la phase aqueuse est précipité par 2 volumes d'éthanol 95%. Le culot obtenu est lavé à l'éthanol 70% puis séché et repris dans 50 µl d'eau milliQ stérile contenant 20 µg/ml de Rnase A.

II.5.2 Amplification d'ADN plasmidique : utilisation du PEG

Cette technique permet d'obtenir de grande quantité de plasmide particulièrement pur ce qui rend la préparation particulièrement apte à la transfection des cellules eucaryotes.

Les bactéries transformées sont mises à proliférer à 37°C sous agitation constante pendant 16 heures dans 250 ml de milieu LB puis sont centrifugées 12 min à 2500 g, 4°C. Le

culot obtenu est ressuspendu dans 8 ml de GTE (9 g de glucose, 25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8, 20 ml d'EDTA 0,5 M pH 8, H₂O qsp 1 l) additionnés de 200 µl de lysozyme à 50 mg/ml. 16 ml d'une solution fraîchement préparée de NaOH 0,2 N, SDS 1% sont ajoutés ; le contenu du tube est mélangé doucement par retournement et incubé 5 min dans la glace. Après addition de 12 ml de CH₃COOK 3 M/HCOOH 1,8 M (147 g CH₃COOK, 5 ml d'acide formique, H₂O qsp 500 ml), le mélange est centrifugé 10 min à 5000 g, 4°C. Le surnageant est filtré sur gaze puis 12 ml de PEG₆₀₀₀ 40% sont ajoutés ; le tout est agité, incubé 30 min dans la glace puis centrifugé 20 min à 6000 g, 4°C. Le culot obtenu est repris dans 2 ml d'eau milliQ stérile puis additionné d'1 ml de NH₄Ac 7,5 M, incubé 15 min dans la glace puis centrifugé 15 min à 10 000 g, 4°C. Le surnageant est prélevé et incubé 1 heure à 37°C en présence de Rnase 10 mg/ml puis en présence de protéinase K 10 mg/ml. Une extraction phénol-chloroforme est réalisée, la phase aqueuse récupérée et précipitée par 0,6 volume d'isopropanol. Le culot est repris dans 500 µl d'eau milliQ stérile additionnée de 180 µl de PEG₆₀₀₀ 40%/LiCl 2,5 M, vortexé, incubé 30 min à température ambiante et centrifugé 15 min à 10 000 g, température ambiante. Il est lavé à l'éthanol 70%, séché et repris dans de l'eau milliQ stérile.

III – TECHNIQUES D'ETUDE DES ACIDES NUCLEIQUES

III.1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir des cellules en culture selon une méthode dérivée de celle de Chomczynski et Sacchi (363).

Les cellules sont, dans un premier temps, lysées avec une solution contenant du thiocyanate de guanidium et du phénol (1 ml pour 10⁶ cellules, RNA PLUS[®] - BIOPROBE SYTEMS). Après addition de 200 µl de chloroforme et agitation rapide, la préparation est incubée 5 min dans la glace puis soumise à une centrifugation (12 000 g, 20 min, à 4°C). Les ARN totaux contenus dans la phase aqueuse sont ensuite précipités par un volume équivalent d'isopropanol froid (30 min, 4°C). Après centrifugation (12 000 g, 15 min, à 4°C), le culot d'ARN est lavé avec 400 µl d'éthanol 75% froid puis de nouveau centrifugé (10 000 g, 15 min, à 4°C). Il est alors séché sous vide et remis en suspension dans de l'eau MilliQ stérile additionnée d'un inhibiteur de RNAses (DEPC 0,1% (v/v)).

La quantification des ARN totaux est réalisée par dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 260 nm, une unité d'absorbance correspondant à 40 µg d'ARN/ml (Sambrook et al. (364)). L'intégrité des ARN et l'absence de contamination protéique sont contrôlées respectivement par électrophorèse sur gel d'agarose et mesure du rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} qui doit être compris entre 1,8 et 2.

III.2 Extraction de l'ADN génomique

Les cellules sont décrochées de leur support et sont lysées sous agitation (4h à 37°C) dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8, contenant de l'EDTA 5 mM, du NaCl 100 mM, du SDS 0,5% (v/v) et de la protéinase K 10 µg/ml. Après addition de NaCl 1M, le mélange est placé 1h à 4°C puis centrifugé (10 000 g, 30 min, 4°C). Les acides nucléiques contenus dans le surnageant sont séparés des protéines par un traitement au phénol (0,5 v)/chloroforme (0,5 v) (centrifugation 10 000 g, 30 min, 4°C) puis sont précipités par un volume d'isopropanol (16 h à - 20°C). Le culot d'ADN génomique récupéré après centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C) est lavé à l'éthanol 75%, séché et remis en suspension dans de l'eau MilliQ stérile additionnée de RNase "Dnase free" 10 µg/ml (incubation 30 min à 37°C).

La quantité d'ADN obtenue est mesurée par spectrophotométrie à $\lambda = 260$ nm, une unité d'absorbance correspondant à 50 µg/ml d'acide nucléique. L'intégrité de l'ADN génomique et l'absence de contamination protéique sont contrôlées respectivement par électrophorèse sur gel d'agarose et mesure du rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} qui doit être compris entre 1,8 et 2.

III.3 Amplification enzymatique en chaîne (PCR)

III.3.1 Choix des amorces

Certains critères conditionnent le choix de ces amorces :

- leur spécificité établie selon les données de la GENBANK ;

- leur teneur en bases puriques au niveau de l'extrémité 3'-OH qui favorise la stabilité des hybrides formés lors de l'initiation de la polymérisation, les amorces ne devant de plus pas former de structures secondaires stables, ni s'hybrider entre elles ;
- leurs températures d'hybridation qui doivent être relativement proches afin que dans les mêmes conditions de travail, la spécificité de chaque amorce soit maximale.

Ces paramètres sont vérifiés à l'aide du logiciel OLIGO V₂.

III.3.2 Amplification enzymatique en chaîne

Les amplifications enzymatiques en chaîne ont été réalisées dans un thermocycleur MINICYCLER[®] MJ RESEARCH INC. Chaque cycle d'amplification comporte trois étapes : une dénaturation à 95°C (1 min), une hybridation à une température variable, fonction du couple d'amorces choisi (1 min) et une élongation à 72°C (2 min). La mise au point des conditions expérimentales passe par le choix de la température d'hybridation des amorces, de leurs concentrations respectives dans le milieu réactionnel et du nombre de cycles réalisés et cela de sorte à augmenter la spécificité et l'intensité des fragments obtenus (Tableau III).

Nom de l'amorce	Séquence 5'→ 3'	Tm (°C)	Position sur la séquence
μ-calpaine humaine 1	GGCCAGGGAGCTGGGCCTGGGC	80	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 210 à 232
μ-calpaine humaine 2	CGGTCGGCCTTCCCTCCTTC	80	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 2836 à 2855
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	56	Complémentaire à la séquence comprise entre les nucléotides 3217 à 3236
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	64	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 3071 à 3092
pTet-Splice amont	AAGTCGAGTTTACCACTCCC	60	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 250 à 270
pTet-Splice aval	CCTTCACAAAGATCCGCCTC	62	Complémentaire à la séquence comprise entre les nucléotides 670 à 690

Tableau III : *Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification enzymatique en chaîne*

Les amorces des fragments amplifiés ont été choisies d'après la séquence de la μ-calpaine humaine (Aoki et al. (365)) et des vecteurs pOPRSVI/MCS (STRATAGENE) et pTet-Splice (GIBCO).

Le milieu réactionnel, d'un volume final de 25 µl est composé de l'ADN matrice, du tampon d'amplification (Tris-HCl 10 mM pH 8,3 ; MgCl₂ 2 mM ; gélatine 100 µg/ml ; KCl 50 mM), des amorces sens et antisens (1 µM), de chaque dNTP (200 µM) et d'eau milliQ stérile (qsp volume final). Le mélange est recouvert d'huile minérale puis soumis à une dénaturation de 12 min à 95°C. Au terme de cette étape, 2 unités de Taq polymérase (PROMEGA) sont ajoutées ; l'amplification est aussitôt initiée. Les fragments amplifiés sont conservés à 4°C.

III.3.3 Différentes matrices utilisées

- ADN génomique

Dans le but de vérifier l'intégration des vecteurs des systèmes LacSwitch II et Tet-Regulated Expression System dans le génome des cellules C2C12, des PCR sur l'ADN génomique de ces cellules ont été effectuées. Après extraction, 2 µg d'ADN génomique ont été ajoutés au milieu réactionnel.

- Plasmides

Différents plasmides ont fait l'objet de réactions de PCR :

- . pOPRSVI/MCS - µ-calpaine : vecteur du système LacSwitch II;
- . pTet-Splice - µ-calpaine : vecteur du système Tet-Regulated Expression System ;
- . pUC8 où l'ADNc codant pour la sous-unité catalytique de la µ-calpaine humaine a été inséré au niveau du site *EcoR* I.

- ADN issu d'une colonie bactérienne

Lors du clonage du gène d'intérêt dans le site multiple de clonage des vecteurs pOPRSVI/MCS et pTet-Splice, des PCR ont été réalisées directement sur les colonies bactériennes obtenues par transformation avec le produit de ligation. Pour cela, une colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'un bâtonnet stérile et diluée dans 100 µl d'eau milliQ stérile ; une fraction est prélevée et utilisée comme matrice pour la réaction de PCR. Les concentrations finales des différents réactifs sont identiques à celles définies précédemment, le volume final de la réaction étant de 50 µl.

III.4 TRANSCRIPTION INVERSE ET AMPLIFICATION ENZYMATIQUE EN CHAÎNE (RT-PCR)

III.4.1 *Transcription inverse*

Elle est précédée d'une étape permettant l'inactivation des ribonucléases et la dégradation de l'ADN génomique. Les oligonucléotides utilisés comme amorces dans cette réaction de transcription inverse sont choisis de telle sorte qu'ils soient le plus spécifique possible des ARNm cibles (caractéristiques établies selon les données de la banque GENBANK).

10 ou 20 µg d'ARN totaux sont incubés 15 min à 37°C dans 10 µl de milieu réactionnel (Tris-HCl 50 mM pH 8,3 ; KCl 75 mM ; MgCl₂ 3 mM ; DTT 20 mM) contenant 20 unités d'inhibiteur de RNAses (Rnasin, PROMEGA) et 14 unités de Dnase I (BOEHRINGER MANHEIM).

Les dNTP (250 µM chacun), l'amorce antisens 2 µM et 100 unités de transcriptase inverse du virus de la leucémie murine de Moloney (M-MuLVRT, GIBCO-BRL) sont alors ajoutés puis le mélange est incubé pendant une heure à 37°C. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à - 20°C.

III.4.2 *Amplification enzymatique en chaîne*

Les amplifications enzymatiques sont réalisées selon le protocole décrit dans le paragraphe III.3.2 en utilisant comme matrice les ADNc issus de la transcription inverse ; 5 µl d'ADNc sont requis pour cette amplification.

Les caractéristiques des différentes amorces utilisées sont détaillées dans le tableau IV.

Nom de l'amorce	Séquence 5'→ 3'	Tm (°C)	Position sur la séquence
μ-calpaine Sens (souris)	GGTCAGCCTGTGCACTTGAAGCG	72	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 1382 à 1404
μ-calpaine Sens (humain)	TGGTGGGCCAGCCGGCCGTACAC	80	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 1498 à 1520
m-calpaine Sens (souris)	CACAACCCGAGCCAGGGAGCG	76	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 1416 à 1437
μ/m-calpaine Antisens (souris/humain)	TTGTGGGGCTCGAAGGTGGAGGG	74	Complémentaire à la séquence comprise entre les nucléotides 1511 à 1533
p94 Sens	CTCCTTCTGGTCTGAACATGGGG	72	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 830 à 852
p94 AS	GTGACGGTCTGTCATCTGAGGCC	74	Complémentaire à la séquence comprise entre les nucléotides 921 à 943
Calpastatine Sens	GGCACTGGGTATAAAAGAAGGG	66	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 513 à 536
Calpastatine Antisens	CATCTATAGCCTGGTCAGTCCC	68	Complémentaire à la séquence comprise entre les nucléotides 616 à 637
Lac I Sens	GCAAACAGTCGTTGCTGATTGGC	70	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 2857 à 2879
Lac I Antisens	TGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC	72	Complémentaire à la séquence comprise entre les nucléotides 3711 à 3734
GAPDH Sens	AAGGTCATCCCAGAGCTGAACGG	72	Identique à la séquence comprise entre les nucléotides 695 à 717
GAPDH Antisens	ACAACCTGGTCCTCAGTGTAGCC	72	Complémentaire à la séquence comprise entre les nucléotides 863 à 885

Tableau IV : *Caractéristiques des amorces utilisées pour la RT-PCR des ARNm des calpaines ubiquitaires, de la p94, de la calpastatine, de Lac I et de la GAPDH.*

Les amorces des fragments respectivement amplifiés ont été choisies d'après les séquences publiées par Aoki et *al.* (366), Poirier et *al.* (367) et Dear et *al.* (368), Richard et *al.* (369) (114 pb), Lee et *al.* (370) (127 pb), STRATAGENE (878 pb), (Sabath et *al.* (371)) (191 pb).

III. 5 Contrôle des produits d'amplification et analyse électrophorétique

III.5.1 Contrôle des produits d'amplification par digestion enzymatique

Afin de vérifier la nature des fragments obtenus, les ADN amplifiés sont digérés par des enzymes de restriction. La digestion enzymatique est spécifique de chaque fragment amplifié et, sur la base de leur séquence, permet de s'assurer que ce sont les fragments attendus.

Les fragments amplifiés sont précipités pendant 5 min à 4°C en présence de 0,6 volume d'acétate d'ammonium 10 M et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après 10 min de centrifugation à 12 000 g à 4°C, le culot d'acide nucléique est lavé avec 200 µl d'éthanol à 70°. Après une seconde centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est séché sous vide et remis en suspension dans de l'eau MilliQ stérile.

La quantité d'ADN est alors mesurée au spectrophotomètre à $\lambda = 260$ nm (une unité d'absorbance correspond à 50 µg d'ADN/ml).

Les digestions sont réalisées pendant 2 heures avec 2 unités d'enzyme/µg d'ADN. Les produits d'hydrolyse sont ensuite analysés par électrophorèse.

III.5.2 Analyse électrophorétique

III.5.2.1 Gel de polyacrylamide

Les produits d'amplification, additionnés de tampon de charge 10X (Tris 20 mM, saccharose 40% (p/v), bleu de bromophénol 0,25% (p/v) et EDTA 100 mM) sont déposés sur un gel vertical de polyacrylamide (acrylamide 9,5% (p/v), bisacrylamide 0,5% (p/v)).

La migration est réalisée sous une intensité constante de 80 mA pendant 3 h dans un tampon de migration Tris 90 mM pH 8, acide borique 90 mM, EDTA 15 mM. Après une coloration du gel dans un bain de bromure d'éthidium (0,8 mg/l), les fragments amplifiés sont visualisés par fluorescence sous lampe UV ($\lambda = 254$ nm). La taille des signaux observés est déterminée

par comparaison à la migration simultanée d'un marqueur (ADN de ϕ X 174 digéré par *Hinf* I, EUROGENTEC).

L'intensité des fragments amplifiés est quantifiée par vidéo-densitométrie (Gel Doc 2000, logiciel Quantity one, BIORAD). La linéarité de la réponse et sa reproductibilité sont contrôlées par référence à une courbe de calibration réalisée avec différentes quantités de produits d'amplification.

III.5.2.2 Gel d'agarose

Les fragments d'ADN d'une taille supérieure à 300 pb sont visualisés par électrophorèse en gel d'agarose. Les échantillons, additionnés de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,04% (p/v), xylène cyanol 0,04% (p/v), saccharose 6,7% (p/v)) sont déposés sur un gel horizontal d'agarose (pourcentage allant de 0,7 à 2% (p/v)) contenant du bromure d'éthidium (1 μ g/ml).

La migration est réalisée en tampon Tris-acétate 40 mM, pH 8, EDTA 1 mM, sous voltage constant, en suivant le bleu de bromophénol et le xylène cyanol comme marqueurs de front. La taille des fragments, visualisés sous UV à $\lambda = 254$ nm, est évaluée par rapport à celle des marqueurs (ADN du phage λ digéré par *Hind* III ou ADN de ϕ X 174 digéré par *Hae* III (EUROGENTEC)).

III.6 Southern-blot

Sur l'ADN génomique des cellules, une amplification enzymatique en chaîne est réalisée. Les fragments qui en sont issus sont observés sur gel d'agarose et transférés, selon le protocole décrit par Sambrook et *al.* (372), sur une membrane de Nylon chargée positivement (BOEHRINGER MANHEIM) afin de permettre leur révélation par hybridation.

III.6.1 Marquage de la sonde oligonucléotidique

Ce marquage a été effectué à l'aide d'un kit "DIG oligonucleotide 3'-end labelling" (BOEHRINGER MANHEIM). La sonde oligonucléotidique (26 pb), est marquée à son extrémité 3'-OH par addition d'une seule didéoxyuridine triphosphate couplée à la DIG (DIG-ddUTP)

catalysée par la terminale transférase. Le milieu réactionnel, constitué de 100 pmol d'oligonucléotides à marquer, de tampon de réaction (cacodylate de potassium 0,2 M, Tris-HCl 25 mM, SAB 0,25 mg/ml), de CoCl_2 5 mM, de DIG-ddUTP 50 μM et de 50 unités de terminale transférase, est incubé 15 min à 37°C puis placé dans la glace. La réaction est stoppée par addition de 2 μl de solution constituée de glycogène 100 $\mu\text{g/ml}$ et EDTA 0,2 mM pH 8. Les oligonucléotides ainsi marqués peuvent être conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

III.6.2 Préhybridation et hybridation sur membrane

Un volume approprié de tampon d'hybridation, soit 20 ml pour une membrane de 100 cm^2 , (N-laurylsarcosine 0,1% (p/v), SDS 0,02% (p/v), solution bloquante (BOEHRINGER MANHEIM) 1% (p/v), SSC 5X qsp volume final) est préchauffé à la température d'hybridation (50°C). La membrane est alors incubée dans ce tampon sous agitation ménagée dans un four à hybridation (Mini Hybridation Oven, APPLIGENE). La sonde marquée est diluée dans le tampon d'hybridation à raison de 2,5 ml de solution pour une membrane de 100 cm^2 . L'incubation est réalisée à 50°C, sous agitation et pendant 3 h. Au terme de l'hybridation, deux rinçages successifs, deux fois 5 min, à température ambiante, dans un grand volume de SSC 2X (NaCl 3 M, Citrate de Sodium 0,3 M) additionné de SDS 0,1% (p/v), sont nécessaires. La membrane est à nouveau immergée deux fois 15 min, à la température d'hybridation et sous agitation constante, dans du SSC 0,1X additionné de SDS 0,1% (p/v). La solution d'hybridation contenant la sonde marquée à la DIG peut être stockée à -20°C et être réutilisée plusieurs fois.

III.6.3 Immunodétection

Les lavages stringents de la membrane sont suivis d'un rinçage (1 min) dans un tampon contenant de l'acide maléique 0,1 M et du NaCl 0,15 M, pH 7,5. Afin de saturer les sites de liaison non spécifiques des anticorps, la membrane de Nylon est incubée 30 min dans une solution bloquante (BOEHRINGER MANHEIM) diluée à 1% dans le tampon d'acide maléique. Les anticorps anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline, dilués au 1/10000^{ème}, sont alors ajoutés. L'incubation en présence des anticorps est réalisée à température ambiante, pendant 30 min et sous agitation constante. La membrane est rincée deux fois 15 min dans le tampon d'acide maléique et équilibrée 5 min dans du tampon de détection (Tris-HCl 0,1 M,

NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5). Les complexes ADN/sonde sont alors révélés sur la membrane par chimiluminescence grâce au système “CSPD-ready-to-use” (BOEHRINGER MANHEIM).

IV – TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

IV.1 Analyse électrophorétique et immunorévélation des protéines

IV.1.1 Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont détachées mécaniquement de leur support, homogénéisées dans un tampon PBS pH 7,4 (EGTA 5 mM, DTT 0,5 mM, NaN₃ 1 mM, leupeptine 20 µM, benzamidine 10 mM et PMSF 1 mM) puis lysées par sonication.

La concentration protéique est déterminée par la méthode du Biuret en utilisant une solution de sulfate de cuivre et d'acide bicinchoninique (réactif de PIERCE BCA). Les échantillons (5 µl de solution à doser, 95 µl d'eau distillée, 2 ml de réactif) sont incubés à 60°C pendant 30 min puis refroidis à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est alors mesurée à $\lambda = 562$ nm. La concentration protéique est déterminée à partir d'une gamme étalon établie avec la sérum albumine bovine 2 mg/ml (PIERCE) comme protéine de référence.

IV.1.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les séparations électrophorétiques des protéines sont réalisées en conditions dénaturantes sur des gels de polyacrylamide (10% (p/v)) selon la technique de Laemmli (373). Après dénaturation à 100°C, 5 min, des échantillons additionnés de Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8, SDS 1% (p/v), bleu de bromophénol 0,01%, glycérol 30% et 2-ME 9% (v/v), la migration électrophorétique est effectuée sous une intensité constante de 25 mA en tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,6, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v). La migration simultanée d'un mélange protéique (kit de calibration de faible masse moléculaire (PHARMACIA)) permet de déterminer la masse moléculaire des protéines analysées.

Les protéines sont ensuite colorées dans une solution de méthanol 40% (v/v), d'acide acétique 50% (v/v) et d'eau distillée 10% (v/v) contenant du bleu de Coomassie 0,25% (p/v) (Brillant Blue R 250).

IV.1.3 Electrotransfert

Celui-ci est réalisé selon la technique de Towbin et *al.* (374).

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane Immobilon P (MILLIPORE) ou de nitrocellulose Hybond™ ECL™ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) selon le type de révélation (respectivement anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline et à la peroxydase, révélation ECL électrochimiluminescence). Le transfert s'effectue en milieu semi-sec (Electro-Blotter MILLIPORE), en tampon Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v) et méthanol 15 ou 20% (v/v), sous une intensité constante de 2,5 mA/cm² pendant 30 min à 1 heure suivant la taille de la protéine recherchée.

IV.1.4 Immunorévélation des protéines

La membrane est réhydratée dans un bain de méthanol puis d'eau distillée (membrane Immobilon P) ou bien dans un bain d'eau distillée seul dans le cas de la nitrocellulose (membrane Hybond™ ECL™) puis saturée dans du TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 138 mM et KCl 2,7 mM) additionné de 5% (p/v) de lait écrémé en poudre pendant 2 heures, sous agitation constante et à température ambiante. Elle est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans un tampon TBS supplémenté de lait en poudre à 5% (p/v), selon les conditions décrites dans le tableau V.

Antigène	Hôte	Immunogène	Dilution et conditions d'incubation	Masse moléculaire (kDa)	Origine
μ-calpaine (sérum)	Chèvre	μ-calpaine native (muscle de lapin)	1/500 2h, température ambiante	80	INRA
μ-calpaine (monoclonal)	Souris	μ-calpaine native (ascite)	1/1000 2h, température ambiante	80	CHEMICON
m-calpaine (sérum)	Chèvre	m-calpaine native (muscle de lapin)	1/500 2h, température ambiante	80	INRA

Antigène	Hôte	Immunogène	Dilution et conditions d'incubation	Masse moléculaire (kDa)	Origine
p94 (polyclonal purifié)	Lapin	Région NS1/NS2 protéine (homme)	1/500 4h, température ambiante	94	CHEMICON
Calpastatine (polyclonal purifié)	Mouton	Peptide C-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	120	TEBU
Myogénine (polyclonal purifié)	Lapin	Protéine complète (rat)	1/500 4h, température ambiante	37	TEBU
MRF 4 (Myf 6 ou herculine) (polyclonal purifié)	Lapin	Peptide recombinant (rat)	1/500 12h, 4°C	55	TEBU
Myo D (polyclonal purifié)	Lapin	Peptide C-term. (souris)	1/1000 2h, température ambiante	33	TEBU
Myf-5 (polyclonal purifié)	Lapin	Peptide C-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	44	TEBU
Actine (polyclonal purifié)	Chèvre	Peptide C-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	43	TEBU
Annexine VI (polyclonal purifié)	Chèvre	Peptide N-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	69	TEBU
β-tubuline (polyclonal purifié)	Lapin	Peptide C-term. (homme)	1/1000 4h, température ambiante	55	TEBU
Cavéoline 3 (polyclonaux purifiés)	Lapin	Peptide C-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	26	TEBU
Desmine (monoclonal)	Lapin	Protéine complète (poulet)	1/1000 2h, température ambiante	55	SIGMA
Dystrophine (monoclonal)	Souris	Peptide C-term. (homme)	1/1000 2h, température ambiante	427	SIGMA
Ezrine (polyclonal purifié)	Chèvre	Peptide C-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	80	TEBU
Fibronectine (monoclonal)	Souris	Protéine complète (humain)	1/1000 2h, température ambiante	215	SIGMA
Spectrine α II (polyclonal purifié)	Chèvre	Peptide C-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	220	TEBU
Taline (polyclonal purifié)	Chèvre	Peptide C-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	225	TEBU
Vimentine (polyclonal purifié)	Chèvre	Peptide N-term. (homme)	1/500 4h, température ambiante	58	TEBU
Lac I (polyclonal purifié)	Lapin	Protéine purifiée	1/1000 4h, température ambiante	38	STRATAGENE

Tableau V : *Caractéristiques et conditions d'utilisation des anticorps primaires utilisés en immunorévélation.*

Après trois rinçages de 15 min dans du TBS, la membrane est incubée pendant 1 heure, à température ambiante, avec l'anticorps secondaire anti-espèce (couplé à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase) dilué dans du TBS additionné de lait écrémé en poudre 1% (p/v). Après trois nouveaux lavages de 10 min, les protéines d'intérêt sont révélées par une incubation de la membrane avec les substrats des enzymes couplées aux anticorps secondaires (phosphatase alcaline : 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) 0,15 mg/ml et nitro blue tetrazolium (NBT) 0,3 mg/ml, (PROMEGA) / peroxydase : luminol et H₂O₂, (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH)).

Les signaux obtenus sont quantifiés par vidéo-densitométrie (système Gel Doc 2000, logiciel Quantity one, BIORAD).

IV.2 Purification des calpaines ubiquitaires et dosage de leurs activités

IV.2.1 Purification partielle des calpaines ubiquitaires sur FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Après extraction des protéines, dosage (cf. paragraphe IV.1.1) et centrifugation 10 min à 10 000 g, une purification partielle sur chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/5 (PHARMACIA BIOTECH)) est réalisée pour ultérieurement pouvoir doser les activités protéolytiques calcium-dépendantes.

Les échantillons sont déposés sur la matrice de la colonne préalablement équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, NaN₃ 1 mM, filtré sur membrane 0,22 µm. Après application d'un gradient en NaCl de 0 à 0,3 M et du "saut" à 0,5 M en NaCl, les fractions collectées sont testées pour la quantification des activités calpaines.

IV.2.2 Dosage de l'activité calcium-dépendante des calpaines

La mesure de l'activité protéolytique calcium-dépendante des calpaines est basée sur la méthode de Wolfe et *al.* (375) utilisant la caséine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Twining (376)) comme substrat et en mesurant la fluorescence du surnageant

(peptides solubles), suite à une précipitation des protéines non hydrolysées par l'acide trichloroacétique (5%).

L'activité dépendante du calcium est mesurée par la différence entre la mesure d'activité en présence de calcium (activité totale) et celle obtenue en présence d'EGTA (activité indépendante du calcium). La fluorescence est quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre (SHIMADZU type RF-551 S) : $\lambda_{\text{ex.}} = 495 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{ém.}} = 518 \text{ nm}$.

L'activité spécifique est exprimée en unités arbitraires de fluorescence (U.F.) par mg de protéines.

IV.3 Mesure de l'activité de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) par ELISA

Pour tester l'activité du vecteur répresseur pCMVLacI (système LacSwitch II, STRATAGENE) dans les cellules eucaryotes C2C12, nous avons été amenés à transfecter de façon transitoire le vecteur opérateur pOP13CAT (système LacSwitch II, STRATAGENE), vecteur codant pour une protéine bactérienne "reporter" facilement détectable, la CAT (chloramphénicol acétyltransférase type I). Comme précédemment exposé, le vecteur pCMVLacI code de façon constitutive pour une protéine répresseur Lac I qui, fixée sur le site opérateur du second vecteur pOP13CAT, inhibe la transcription de la chloramphénicol acétyltransférase. Lorsque de l'IPTG (iso-propyl-thio-galactoside) est ajouté au milieu, il se lie à la protéine Lac I et diminue ainsi son affinité pour le site opérateur de pOP13CAT. La transcription peut alors se dérouler correctement et l'activité de la CAT dosée selon la méthode ELISA.

IV.3.1 Principe du test CAT-ELISA

Ce test est une réaction immunocytochimique. Des anticorps anti-CAT sont préalablement fixés dans le fond des puits de la plaque de titration. Après la lyse des cellules transfectées, l'extrait cellulaire, qui contient normalement la chloramphénicol acétyltransférase, est placé dans les puits ; l'enzyme va alors se fixer spécifiquement sur les anticorps anti-CAT accrochés à la surface de la plaque. Par la suite, un anticorps primaire

spécifique couplé à la digoxigénine (anti-CAT-DIG) puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (anti-DIG-POD) sont successivement appliqués. Le substrat de la peroxydase est alors ajouté conduisant à une réaction colorée ; l'absorbance, directement corrélée au taux de CAT présent dans l'échantillon, est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA (Figure 18).

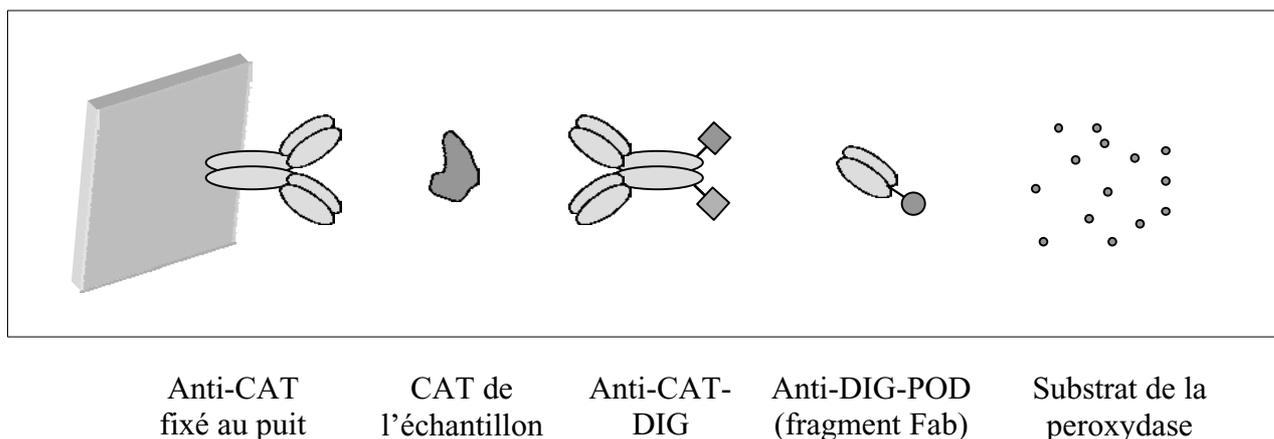


Figure 18 : *Principe du test ELISA (ROCHE)*

IV.3.2 Transfection des cellules et obtention des échantillons

Les cellules C2C12 sontensemencées à 70% de confluence et transfectées de façon identique à la transfection stable (cf. paragraphe I.4.2). 16 heures après, le milieu de culture est renouvelé et les boîtes traitées ou pas à l'IPTG 5 mM. 6 heures après l'induction, les boîtes sont lavées avec du PBS et 1 ml de tampon de lyse est déposé sur les cellules. Après 30 min sous agitation constante à température ambiante, le lysat est recueilli et les débris cellulaires éliminés par centrifugation 10 min à 12 000 g, 4°C. La concentration protéique des échantillons est déterminée.

IV.3.3 Test ELISA

Une gamme de dilution de la CAT (0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 ng/ml) est réalisée pour établir une courbe étalon de calibration. 200 µl de chaque dilution de cette gamme ainsi que 200 µl de chaque échantillon cellulaire (50 à 150 µg par puit) sont déposés dans les puits et la plaque est incubée 1 heure à 37°C. Après rinçage des puits, 200 µl d'anticorps anti-CAT-DIG sont additionnés et la plaque incubée 1 heure à 37°C ; il en est de même pour l'anticorps anti-

DIG-POD. Après le dernier lavage, 200 µl de substrat sont ajoutés et incubés à température ambiante jusqu'à développement de la réaction colorée. La mesure de l'absorbance des échantillons est réalisée à $\lambda = 405 \text{ nm}$ sur un lecteur de plaques ELISA.

IV.4 Mesure de l'activité luciférase

Pour tester l'efficacité du vecteur pTet-tTAk (système Tet-Regulated Expression System, GIBCO-BRL) dans les cellules eucaryotes C2C12, nous avons été amenés à transférer de façon transitoire le vecteur pUHC13-3 de ce même système, qui contient le gène de la luciférase. Comme précédemment décrit, le vecteur pTet-tTAk code pour la protéine tTA qui, en l'absence de tétracycline, va se fixer sur le promoteur Tetp du vecteur pUHC13-3 qui contrôle la transcription du gène luciférase. L'activité de cette enzyme va alors pouvoir être révélée par une réaction de chimiluminescence.

Quarante huit heures après le début de la transfection, les boîtes sont rincées deux fois avec du PBS filtré pH 7,5 puis les cellules sont détachées de leur support et perméabilisées par une solution de lyse (Tris-HCl 25 mM pH 7,8, DTT 2 mM, glycérol 10% et triton X-100 1%).

Après une courte centrifugation (10 000g, 10 secondes), les débris cellulaires sont éliminés. Un mélange d'extrait cellulaire (15% (v/v)) et de Luciférine (85% (v/v) amenée à température ambiante) est placé dans un luminomètre (BERTHOLD) pendant 15 secondes pour mesurer la réaction de chimiluminescence développée (Figure 19).



Figure 19 : *Réaction de chimiluminescence induite par la luciférase*

V – ANALYSE STATISTIQUE

Pour chaque série expérimentale et pour chaque paramètre mesuré, la moyenne arithmétique des n valeurs obtenues est calculée. Chaque moyenne est accompagnée de son erreur standard (ESM). La comparaison des moyennes des valeurs obtenues dans les différents groupes expérimentaux est effectuée par ANOVA suivi du test “t” de Student pour séries indépendantes lorsque les groupes sont comparés (logiciel Minitab). Une différence entre deux moyennes est considérée comme significative lorsqu’elle est associée à une probabilité $p < 0,05$.

RESULTATS

1^{ère} partie

CULTURE SECONDAIRE DE MYOBLASTES DE SOURIS : CARACTERISATION DU MODELE EXPERIMENTAL

MISE EN PLACE ET EVALUATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ACTEURS DU SYSTEME NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT ET DE CERTAINS DE LEURS SUBSTRATS POTENTIELS

Les travaux réalisés au sein du laboratoire concernaient jusqu'à présent l'étude du rôle biologique des calpaines au cours de la différenciation des myoblastes issus de cultures primaires de rat.

L'un des objectifs de l'étude présentée dans ce rapport était de transformer des cellules myogéniques avec un système inductible de sorte à pouvoir y surexprimer de façon contrôlée la μ -calpaine et ainsi en aborder les conséquences physiologiques ; une lignée cellulaire semblait donc être la plus adaptée pour atteindre notre but. La lignée de myoblastes C2C12 a alors été choisie pour entreprendre l'expression stable de la protéase. Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à caractériser ce nouveau modèle expérimental. Ainsi, la fusion des myoblastes a été observée et quantifiée, et l'expression des acteurs du système protéolytique neutre calcium-dépendant a été suivie au cours des différents stades de la différenciation de ces cellules. Dans un second temps, nous avons suivi l'expression de certains des substrats potentiels des protéases calcium-dépendantes : facteurs de transcription myogéniques et protéines du cytosquelette.

I - CARACTERISATION DE LA LIGNEE CELLULAIRE C2C12

La lignée de myoblastes de souris C2C12 a été élaborée dans le laboratoire d'Helen Blau et *al.* (377) à partir d'une lignée cellulaire appelée C2 isolée par Yaffe et Saxel (378) du muscle de patte de souris adulte C3H.

Ce système cellulaire constitue un bon modèle pour étudier la myogenèse et la différenciation cellulaire *in vitro* puisqu'il possède l'ensemble des caractéristiques musculaires.

I.1 Evolution morphologique des myoblastes en culture *in vitro*

Les myoblastes de la lignée C2C12, cellules mononucléées fusiformes, sont mis à proliférer puis à différencier dans un milieu approprié (cf. Matériel et méthodes). A différents stades après l'initiation de la différenciation, les cellules sont fixées et colorées.

Entre j1 et j3 (Figures 20, A et B), les myoblastes migrent, s'alignent et commencent à fusionner pour donner des myotubes possédant quelques noyaux. Lors des stades suivants, correspondants à des phases plus tardives de la différenciation, les myotubes qui continuent à fusionner entre eux acquièrent un nombre important de noyaux (Figures 20, C et D). Ces dernières étapes se caractérisent par l'apparition des striations typiques des myofibrilles.

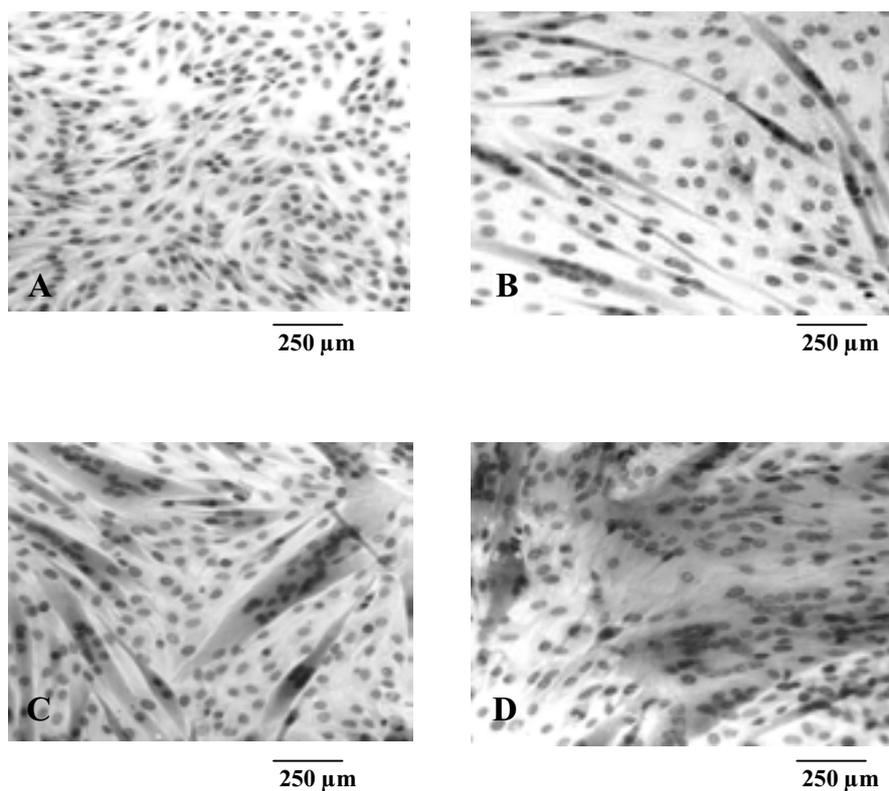


Figure 20 : *Evolution morphologique des myoblastes de la lignée C2C12 au cours de la différenciation*

Les myoblastes sont cultivés en milieu de différenciation puis fixés avec du paraformaldéhyde et colorés à l'hémalum de Hansen 1 jour (A), 3 jours (B), 6 jours (C) et 12 jours (D) plus tard selon le protocole décrit dans le chapitre Matériel et méthodes.

I.2 Caractérisation de la fusion

La quantification de la fusion des myoblastes de la lignée C2C12 a été réalisée sur différentes cultures afin de vérifier que la séquence d'événements intervenant au cours de la différenciation ne subissait que de faibles variations temporelles d'une culture à l'autre.

Les cellules ont été fixées et colorées à différents stades après l'initiation de la différenciation (toutes les 24 heures de j1 à j14), le dénombrement des noyaux des myoblastes et des myotubes a permis l'obtention de la courbe de fusion représentée figure 21.

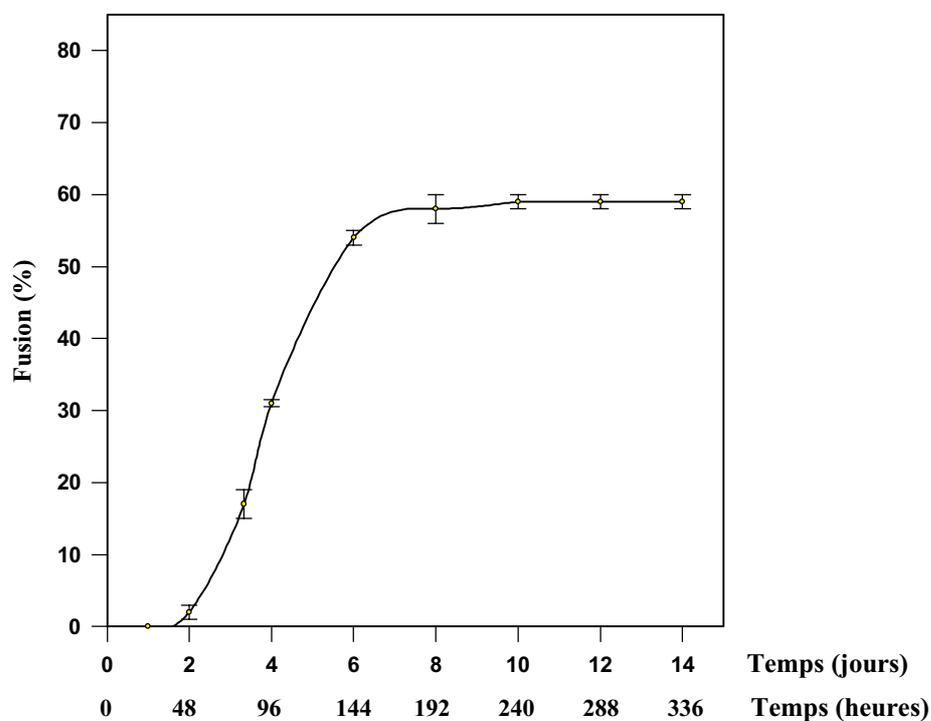


Figure 21 : *Courbe de fusion des myoblastes de la lignée C2C12*

Les myoblastes ont été cultivés dans un milieu de prolifération (DMEM 90%, SVF 10%) jusqu'à environ 80% de confluence. La différenciation a ensuite été induite par addition d'un milieu composé de DMEM 98% et HS 2%. Les pourcentages de fusion ont été évalués après fixation et coloration des cellules à différents stades de culture (du 1^{er} au 14^{ème} jour après l'initiation de la différenciation).

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

Dans nos conditions expérimentales, les myoblastes commencent à fusionner aux environs du deuxième jour après l'induction de la différenciation, le pourcentage de fusion atteignant son maximum au huitième jour. Par la suite, la vitesse du processus diminue progressivement jusqu'au quatorzième jour ; à ce stade, environ 60% des myoblastes ont fusionné et le processus n'évolue quasiment plus. Notons l'apparition de contractions spontanées à partir du cinquième jour.

II - EXPRESSION DES ACTEURS DU SYSTEME PROTEOLYTIQUE NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT AU COURS DE LA MYOGENESE

Une analyse semi-quantitative de l'expression des différents acteurs du système protéolytique neutre calcium-dépendant dans les myoblastes de la lignée C2C12 a été effectuée à différents stades de la différenciation. L'évolution du taux des ARNm spécifiques des trois isoformes de calpaines ainsi que de leur inhibiteur spécifique, la calpastatine, a été suivie par amplification enzymatique en chaîne. L'évolution des protéines correspondantes a simultanément été déterminée par immunodétection.

II.1 Mise en évidence et évolution de l'expression des ARNm spécifiques des calpaines et de leur inhibiteur spécifique, la calpastatine, au cours de la différenciation musculaire

II.1.1 Mise en évidence des ARNm spécifiques

Les ARNm recherchés ont été mis en évidence par amplification enzymatique en chaîne après transcription inverse. La séquence des fragments amplifiés à partir des amorces que nous avons sélectionnées contient des sites de restrictions enzymatiques qui nous permettra, par la suite, de contrôler la nature de ces amplifias (Figure 22).

D'après la séquence de l'ARNm de la μ -calpaine, un fragment de 152 pb devrait être amplifié et son hydrolyse par *Hae* III engendrer deux fragments de 115 et 37 pb. Dans le cas de la m-calpaine, la digestion du fragment amplifié, d'une taille de 117 pb, par l'enzyme *Sma* I devrait conduire à l'obtention de deux fragments de 75 et 42 pb. La digestion par

l'enzyme *Sin I* du fragment amplifié de 114 pb caractéristique de la p94 permettrait l'obtention de deux fragments de 83 et 31 pb. Enfin, les produits de l'hydrolyse par *Mbo I* du fragment amplifié spécifique de la calpastatine, d'une taille de 127 pb, devraient être de 74 et 53 pb.

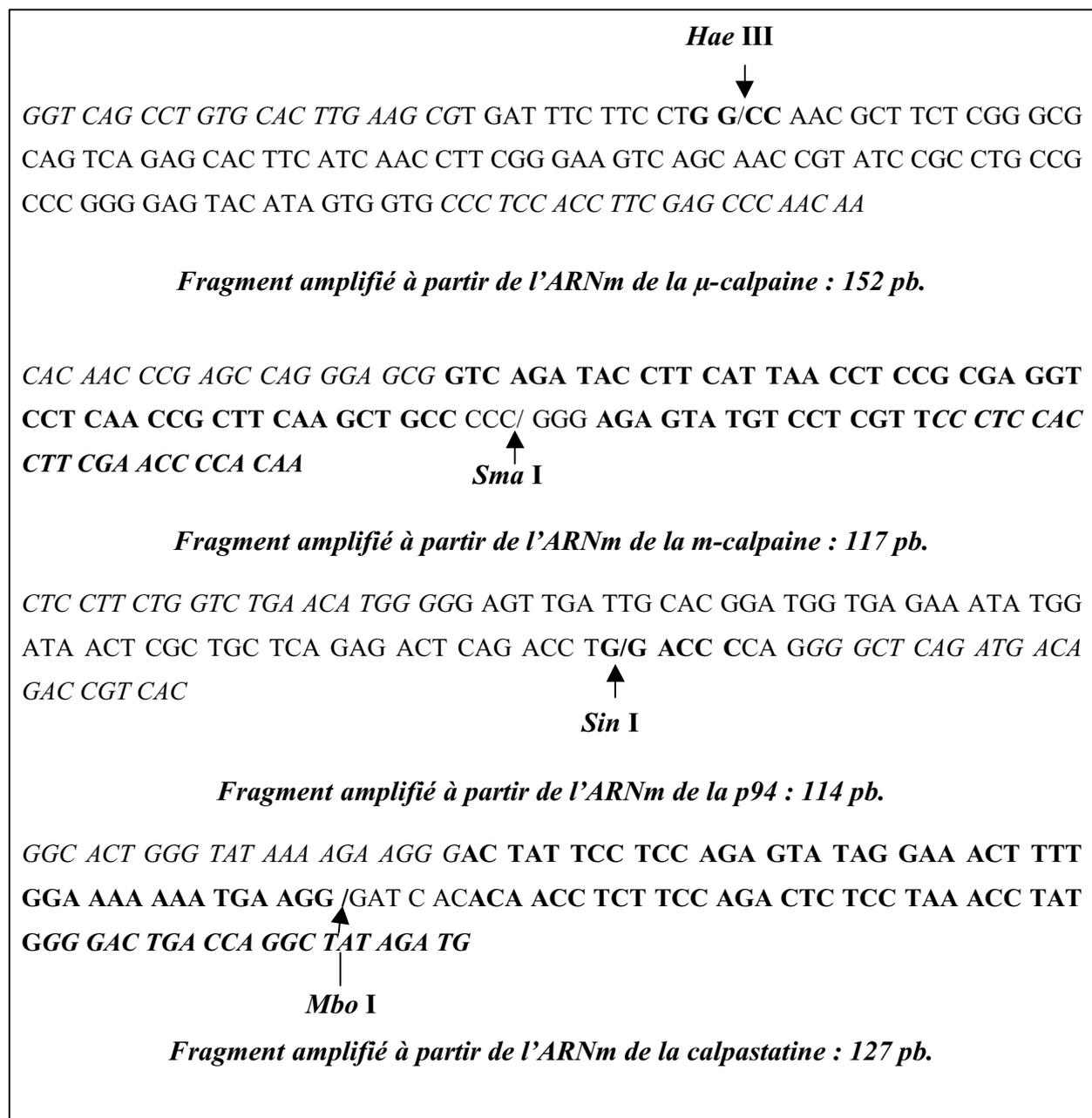


Figure 22 : ***Séquences nucléotidiques des fragments amplifiés à partir des ARNm des calpaines et de la calpastatine***

Les séquences en italique correspondent aux amorces utilisées pour l'amplification enzymatique en chaîne. Les sites de restriction *Hae III*, *Sma I*, *Sin I* et *Mbo I* sont notés en gras.

Les produits obtenus après RT-PCR des ARN totaux extraits de cellules cultivées depuis 5 jours sont analysés par électrophorèse avant et après hydrolyse (Figure 23).

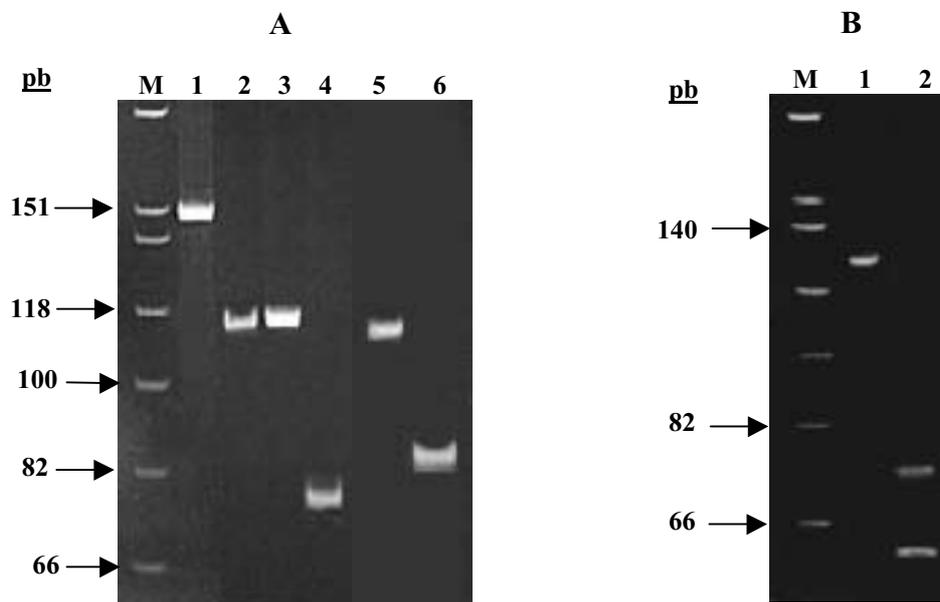


Figure 23 : *Identification des ADNc amplifiés spécifiques des μ -, m-calpaines, p94 (A) et de la calpastatine (B)*

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 10 μ g d'ARN totaux. Les produits obtenus après 35 cycles d'amplification ont été séparés sur un gel de polyacrylamide (10% (p/v)) puis révélés au bromure d'éthidium.

A : Identification des ADN amplifiés spécifiques des 3 isoformes de calpaines

Puits M : ADN de ϕ X174 hydrolysé par *Hinf* I. Puits 1 : ADN amplifié de la μ -calpaine. Puits 2 : ADN amplifié de la μ -calpaine hydrolysé par *Hae* III. Puits 3 : ADN amplifié de la m-calpaine. Puits 4 : ADN amplifié de la m-calpaine digéré par *Sma* I. Puits 5 : ADN amplifié de la p94. Puits 6 : ADN amplifié de la p94 digéré par *Sin* I.

B : Identification de l'ADN amplifié spécifique de la calpastatine

Puits M : ADN de ϕ X174 hydrolysé par *Hinf* I. Puits 1 : ADN amplifié de la calpastatine. Puits 2 : ADN amplifié de la calpastatine digéré par *Mbo* I.

Les tailles des produits de l'amplification des ADNc pour les trois calpaines et la calpastatine ainsi que celles des produits d'hydrolyse correspondent bien à celles attendues. Les fragments d'hydrolyse de petites tailles (31, 37 et 42 pb) ne sont pas visibles sur les profils électrophorétiques.

II.1.2 Evolution des ARNm des calpaines et de la calpastatine au cours de la différenciation

L'évaluation du niveau d'expression a été réalisée en co-amplifiant les ARNm de chacune des protéases et de la calpastatine et ceux codant pour un gène de ménage dont l'expression est réputée pour ne pas varier au cours du processus de différenciation musculaire dans les cellules C2C12. Cette normalisation est nécessaire à la comparaison des différents stades testés, ce gène servant de témoin interne pour les étapes de transcription inverse et de PCR. Bisbal et *al.* (379) ont montré que le niveau d'expression de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ne subissait pas de variation au cours de ce processus ; ses ARNm vont donc nous servir de marqueur cellulaire constitutif.

Une étape de mise au point a été nécessaire pour définir les conditions de cette co-amplification. En règle générale, l'évolution de la quantité d'ADN amplifié croît de façon exponentielle en fonction du nombre de cycles jusqu'à l'obtention d'un plateau qui traduit l'épuisement du milieu en amorces et/ou la diminution de l'activité de la Taq polymérase. L'ADN amplifié est quantitativement évalué dans la phase exponentielle. Les produits d'amplification obtenus en fonction du nombre de cycles ont été analysés sur gel de polyacrylamide. Le fragment correspondant à l'amplification de la GAPDH représente 191 pb. Un exemple de profil électrophorétique (m-calpaine) est présenté figure 24. La quantité de ces produits a été évaluée par analyse vidéo-densitométrique. Elle est exprimée en Logarithme Népérien (ln) de l'intensité relative (%) comparée à celle de la bande observée après 35 cycles d'amplification, choisie arbitrairement comme référence.

La figure 24 montre que la quantité des produits d'amplification de la m-calpaine augmente jusqu'au 29^{ème} cycle puis se stabilise. Dans le cas de la μ -calpaine et de la p94, cette quantité augmente jusqu'au 27^{ème} cycle avant de se stabiliser. L'évolution de la quantité des produits amplifiés est dans tous les cas comparable pour les ADNc des protéases et celui de l'étalon interne (GAPDH). Afin que l'intensité des fragments amplifiés soit suffisamment importante pour être discriminante, le nombre de cycles d'amplification a été fixé à 21, 25 et 24 pour la μ -, la m-calpaine et la p94, respectivement.

En ce qui concerne la calpastatine, la quantité d'ADN amplifié cesse d'augmenter dès le 24^{ème} cycle. Lors des expériences d'amplification menées ultérieurement, le nombre de cycles utilisé sera fixé à 22.

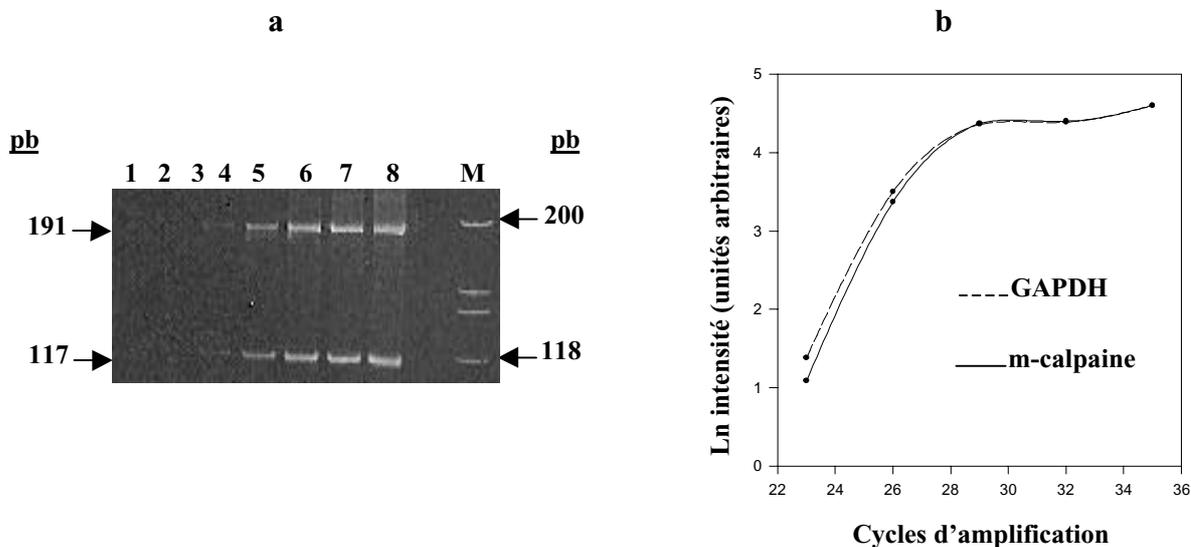


Figure 24 : *Analyse électrophorétique des ADNc de la m-calpain en présence des ADNc étalons (GAPDH)*

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 10 µg d'ARN totaux. Des prélèvements de 10 µl sont effectués après différents cycles d'amplification et analysés sur un gel de polyacrylamide (10% (p/v)).

a : Profil électrophorétique

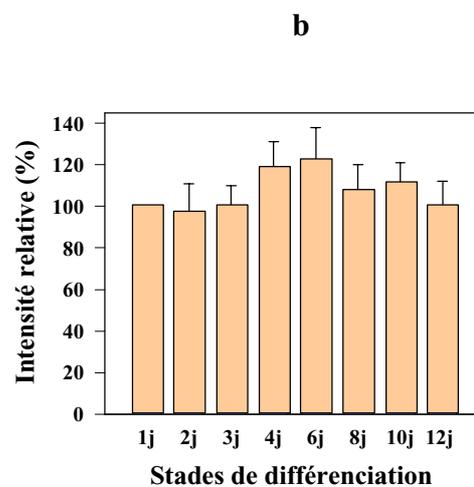
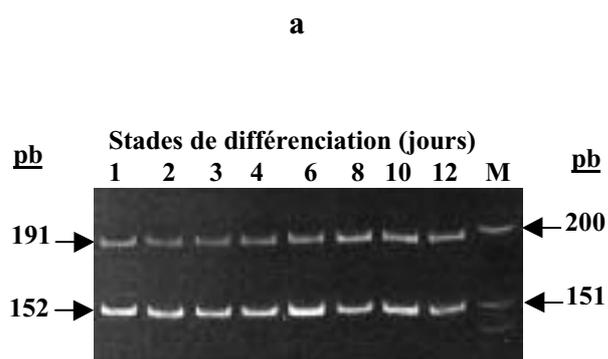
Puits 1 à 8 : ADNc co-amplifiés correspondant respectivement aux cycles : 17, 20, 23, 26, 28, 30, 32, 35. Puits M : ADN de ϕ X174 hydrolysé par *Hinf* I

b : Quantification par vidéo-densitométrie

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

Les profils électrophorétiques et les analyses vidéo-densitométriques (Figures 25 et 26) des produits d'amplification permettent de suivre l'évolution des ADNc et donc des ARNm spécifiques des protéases neutres calcium-dépendantes et de la calpastatine au cours de la différenciation musculaire, pour la lignée C2C12.

A



B

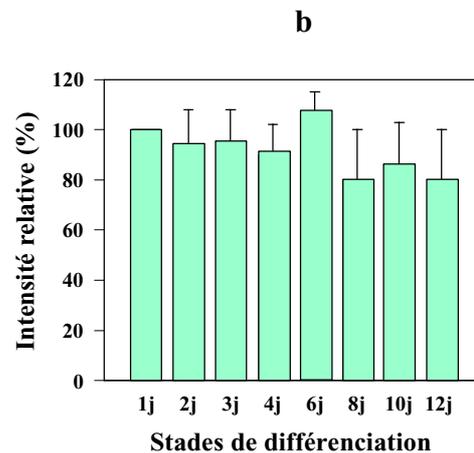
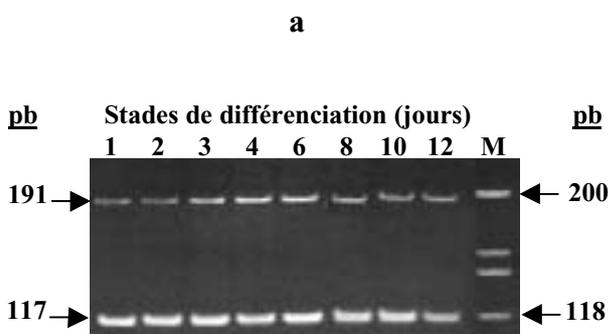


Figure 25 : *Evolution des ARNm spécifiques de la μ - (A) et de la m-calpaines (B) au cours de la différenciation musculaire*

Les ADNc amplifiés (21 cycles (A) et 25 cycles (B)) ont été synthétisés à partir de 10 μ g d'ARN totaux.

a : Profils électrophorétiques

M : ADN de ϕ X174 hydrolysé par *Hinf*I

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est quantifiée par rapport à l'étalon interne et exprimée en pourcentage par rapport à l'intensité obtenue au stade 1 j.

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

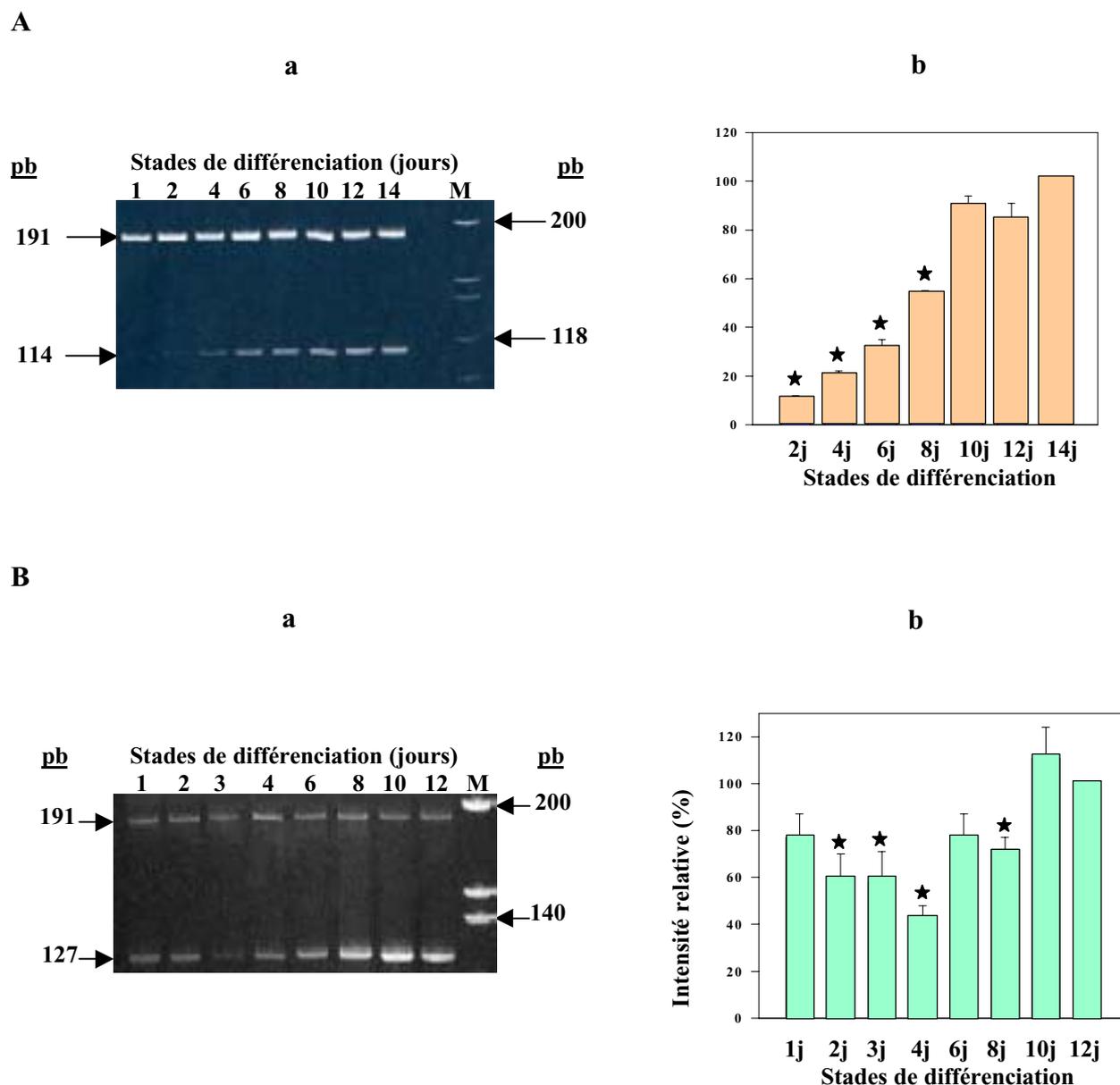


Figure 26 : *Evolution des ARNm spécifiques de la p94 (A) et de la calpastatine (B) au cours de la différenciation musculaire*

Les ADNc amplifiés (24 cycles (A) et 22 cycles (B)) ont été synthétisés à partir de 20 µg (A) ou 10 µg (B) d'ARN totaux.

a : Profils électrophorétiques

M : ADN de ϕ X 174 hydrolysé par *Hinf*I

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est quantifiée par rapport à l'étalon interne et exprimée en pourcentage par rapport à l'intensité obtenue au stade 12 ou 14 j. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3). ★ Différence significative par rapport au stade pris arbitrairement comme témoin (p < 0,05).

Le stade correspondant au premier jour de différenciation (j1) a été choisi arbitrairement comme témoin dans le cas des deux calpaines ubiquitaires, μ - et m-calpaines. Pour la suite de notre étude, cette référence pourra différer d'une expérience à l'autre et ceci dans un souci de clarté de présentation, les variations enregistrées restant proportionnelles quel que soit le témoin adopté.

Malgré une faible augmentation à 6 jours, le taux d'ARNm des deux enzymes ubiquitaires ne subit pas de variation significative pendant tout le processus de différenciation (Figure 25).

Au contraire, les résultats obtenus il y a quelques années au laboratoire dans des cultures primaires de myoblastes de rat avaient mis en évidence une augmentation de la quantité des transcrits codant pour ces enzymes au cours de la différenciation (Cottin et *al.* (380)). Il semblerait donc que les processus de régulation de l'expression de ces protéases varient d'une espèce à l'autre.

Dans le cas de la p94, et par référence au stade 14 jours choisi comme témoin, le taux des transcrits de la protéase augmente progressivement tout au long de la différenciation (Figure 26 A), de la même façon que cela avait été montré dans les cultures primaires de rat (Poussard et *al.* (381)).

Enfin, en ce qui concerne les ARNm spécifiques de l'inhibiteur, leurs taux varient en fonction du stade de différenciation. D'après la figure 26 B, les transcrits codant pour la calpastatine sont présents dès le début de la myogenèse, puis subissent une diminution au début de la fusion des myoblastes puis augmentent lorsque la vitesse de fusion ralentit. Ce mode de régulation a également été observé au cours de la différenciation des myoblastes de rat issus de cultures primaires (Balcerzak et *al.* (382)) ou de la lignée L8 (Barnoy et *al.* (383)).

L'ensemble de ces résultats tend à montrer une différence notable dans la voie de régulation des protéases neutres calcium-dépendantes. En effet, alors que la calpaine spécifique du muscle squelettique subit une régulation transcriptionnelle au cours de la différenciation, l'expression des ARNm des autres enzymes ne semble pas être régulée durant le processus.

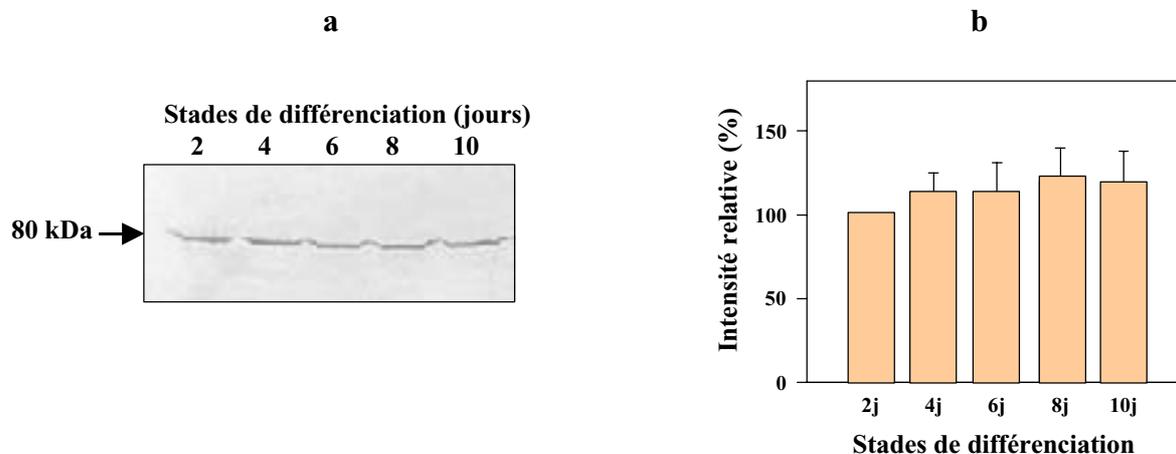
II.2 Mise en évidence et évolution de la quantité des protéases et de leur inhibiteur spécifique, la calpastatine, au cours de la différenciation musculaire

Les variations quantitatives des trois calpaines sont suivies par immunorévélation au cours de la différenciation musculaire. A chaque stade de culture, la même quantité de protéine totale est analysée.

Les figures 27 et 28 permettent de mettre en évidence l'absence de variation significative de la quantité des trois isoformes de calpaines au cours de la différenciation musculaire de la lignée C2C12. De la même façon, les travaux de Barnoy et *al.* (384) avaient montré que la quantité des calpaines ubiquitaires restait constante au cours de la différenciation de la lignée de myoblastes de rat L8.

L'immunorévélation de la calpastatine nous a permis de mettre en évidence une protéine dont la taille est voisine de 120 kDa. D'après les résultats obtenus (Figure 28 B), la quantité d'inhibiteur semble peu varier jusqu'au moment où la vitesse du processus fusionnel ralentit (7 j). Les travaux de Temm-Grove et *al.* (385) utilisant les myoblastes de la lignée C2C12 avaient permis de montrer également un excès de calpastatine en fin de fusion.

A



B

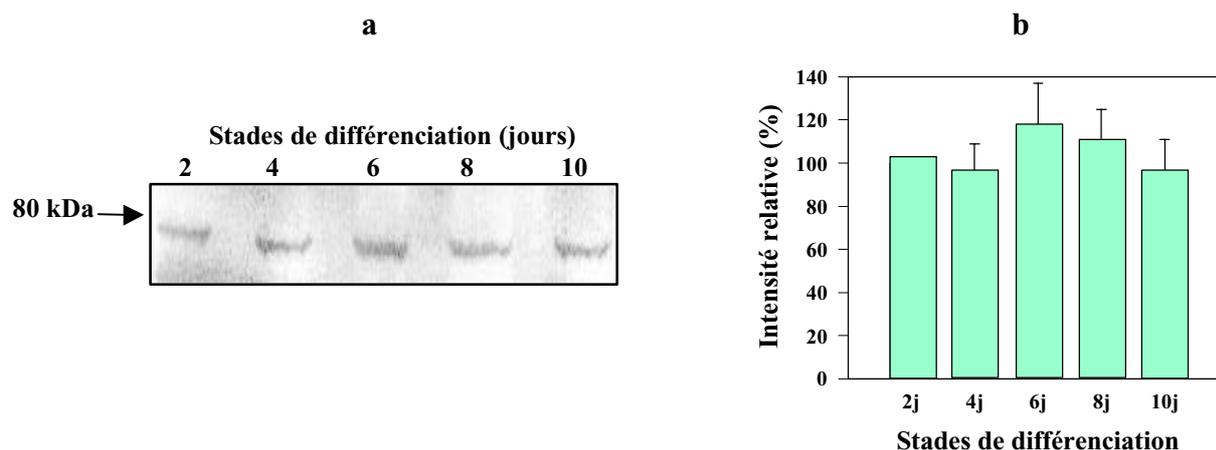


Figure 27 : *Evolution quantitative de la μ - (A) et de la m-calpaines (B) au cours de la différenciation musculaire*

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) à différents stades de différenciation sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la μ -calpaine (dilution 1/500) et contre la m-calpaine (dilution 1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélations

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue au stade 2 j. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

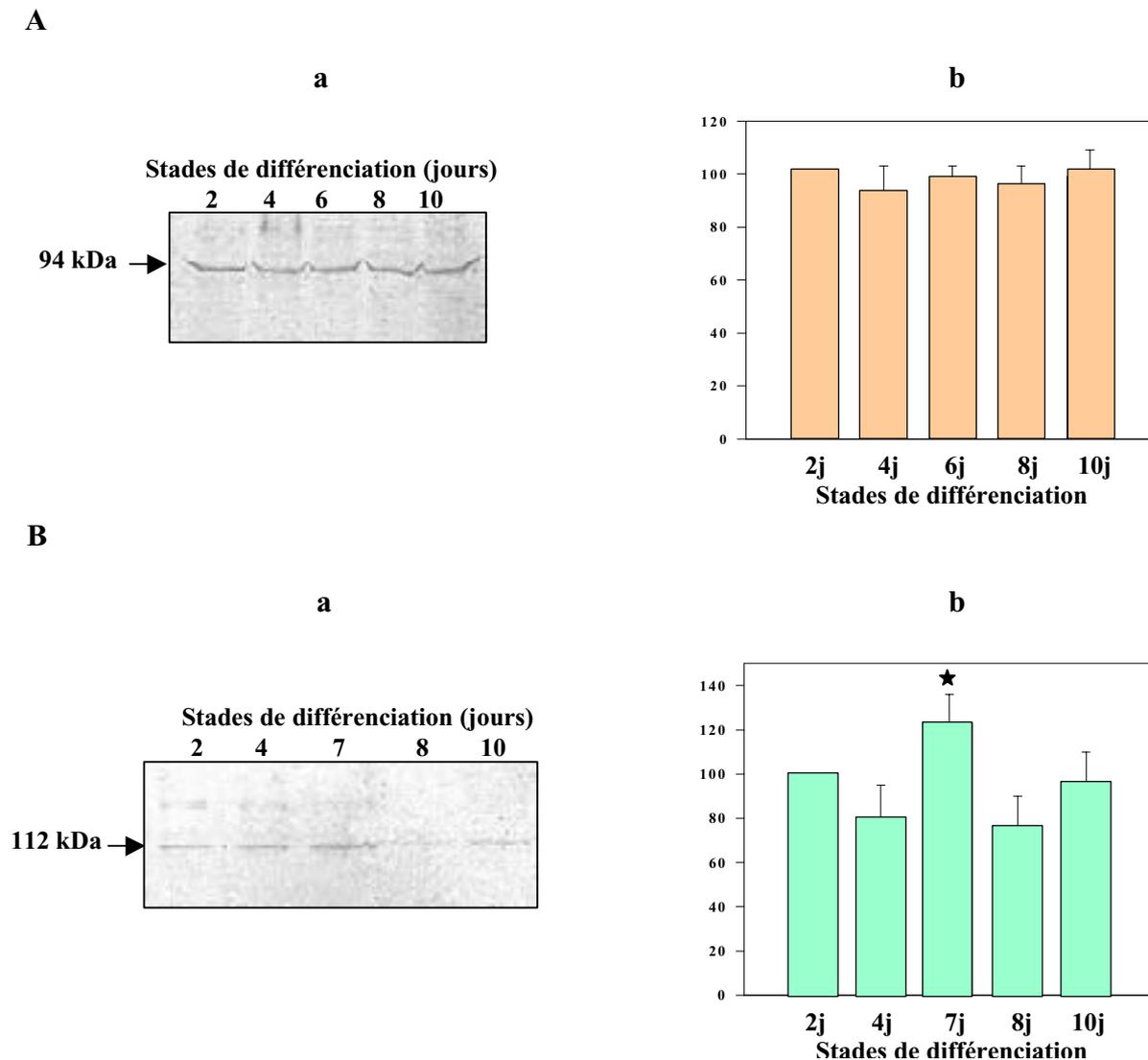


Figure 28 : *Evolution quantitative de la p94 (A) et de la calpastatine (B) au cours de la différenciation musculaire*

Des extraits cellulaires (100 µg de protéines) à différents stades de culture sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la p94 (dilution 1/500) et contre la calpastatine (dilution 1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélations

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue au stade 2 j. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

★ Différence significative par rapport au stade pris arbitrairement comme témoin (p < 0,05).

Les résultats obtenus montrent que les taux d'ARNm et de protéines des calpaines ubiquitaires restent relativement constants au cours du processus de différenciation. Au contraire, le taux des ARNm spécifiques de la p94 augmente corrélativement à la différenciation, alors qu'aucune variation de la quantité de protéine n'est observée au cours de ce phénomène biologique. L'expression de la calpaine spécifique du muscle squelettique semble donc être soumise à une régulation post-transcriptionnelle au cours de la différenciation musculaire dans la lignée C2C12.

Par ailleurs, la régulation de l'expression de l'inhibiteur endogène des calpaines, la calpastatine, est tout à fait comparable à celle observée dans d'autres cellules myogéniques. Dans tous les cas, l'augmentation de sa synthèse en fin de fusion servirait certainement à ralentir l'action de la protéolyse calcium-dépendante.

III - EVOLUTION DE L'EXPRESSION DE SUBSTRATS POTENTIELS DES CALPAINES UBIQUITAIRES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION

Comme cela a été précisé en introduction, l'objectif majeur de ce travail consiste à recréer en culture *in vitro* les circonstances pathologiques inhérentes à la dérégulation de la μ -calpaine, celles-ci étant notamment retrouvées dans certaines dystrophies musculaires. Bien qu'une augmentation d'activité de cette protéase ait été mise en évidence à plusieurs reprises chez des patients atteints de ce type d'affections (Hussain et *al.* (386), Ueyama et *al.* (387), Tidball et *al.* (388)), les conséquences au niveau protéique, notamment en ce qui concerne les substrats potentiels susceptibles de participer aux troubles morbides, restent inconnues. Afin d'examiner le rôle de la μ -calpaine au cours de la fusion des myoblastes, l'étude d'un nombre limité de substrats potentiels s'imposait.

Comme nous l'avons déjà souligné, plusieurs études (Shumway et *al.* (389), Watt et *al.* (390)) ont montré que les calpaines ubiquitaires, la μ -calpaine en particulier, étaient impliquées dans la régulation de certains facteurs de transcription (I κ B α , AP1, c-Fos, c-Jun, c-Myc...). Notre hypothèse serait qu'au niveau du muscle, cette protéase pourrait participer à la régulation de l'expression des facteurs de transcription myogéniques.

D'autre part, une désorganisation de la structure myofibrillaire a été observée sur la plupart des biopsies de patients souffrants de dystrophies musculaires. Une probable atteinte des protéines du cytosquelette et contractiles est envisagée pour expliquer ces manifestations. Enfin, lors de la fusion, une réorganisation cytosquelettique paraît indispensable pour passer de cellules mononucléées à des cellules multinucléées.

Il apparaît donc que l'élucidation des mécanismes de la régulation de la μ -calpaine, ainsi que la connaissance de ses substrats physiologiques seraient d'un grand intérêt pour une meilleure connaissance de ces pathologies musculaires, et plus largement de la myofibrillogenèse.

Comme nous l'avons déjà exposé, au cours de cette étude nous avons, pour atteindre nos objectifs, décidé de tenter de mettre en évidence l'effet de la surexpression de la μ -calpaine sur les facteurs de transcription myogéniques et/ou sur certaines protéines du cytosquelette.

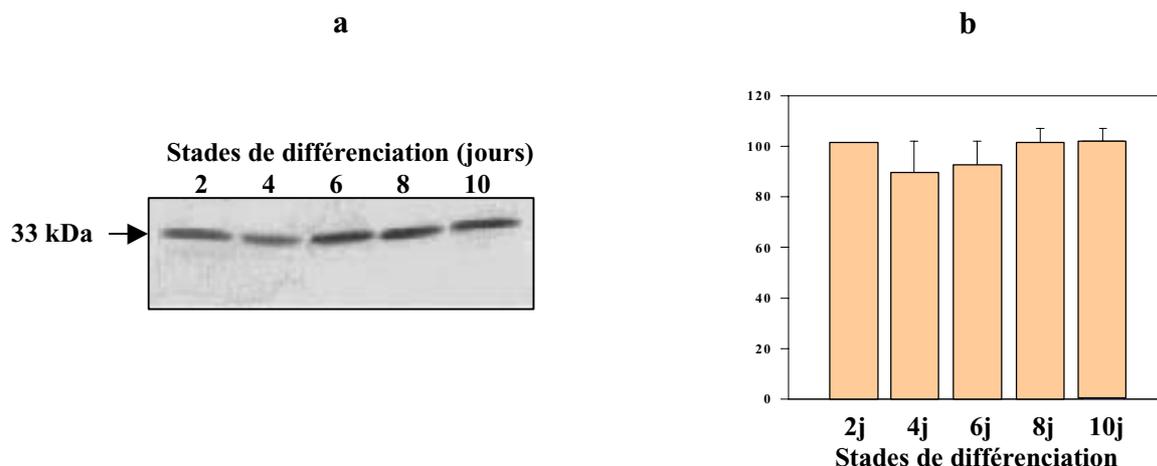
Au préalable, l'évolution de la quantité de ces différentes protéines a été suivie au cours de la différenciation de la lignée C2C12.

III.1 Evolution de la quantité de facteurs myogéniques

La famille des facteurs de transcription spécifiques du muscle squelettique comprend MyoD (Pinney *et al.* (391)), Myf-5 (Braun *et al.* (392)), la myogénine (Edmonson *et al.* (393)) et MRF4 (Braun *et al.* (394)).

Les variations quantitatives de ces quatre protéines ont été suivies par immunorévélation au cours de la différenciation musculaire (Figures 29 et 30).

A



B

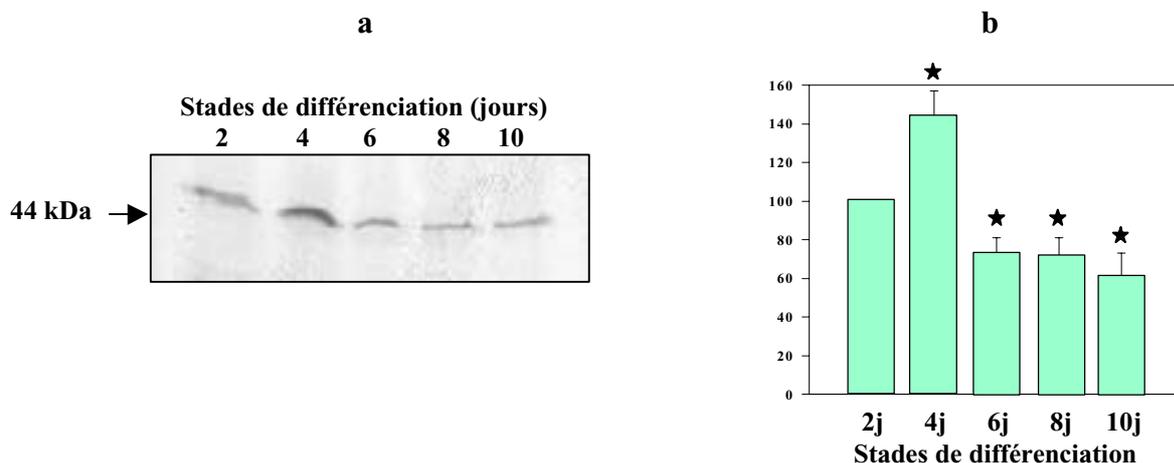


Figure 29 : *Evolution quantitative de MyoD (A) et Myf-5 (B) au cours de la différenciation musculaire*

Des extraits cellulaires (100 µg de protéines) à différents stades de différenciation sont soumis à une SDS-PAGE puis transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre MyoD (dilution 1/1000) et contre Myf-5 (dilution 1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue au stade 2 j. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

★ Différence significative par rapport au stade pris arbitrairement comme témoin ($p < 0,05$).

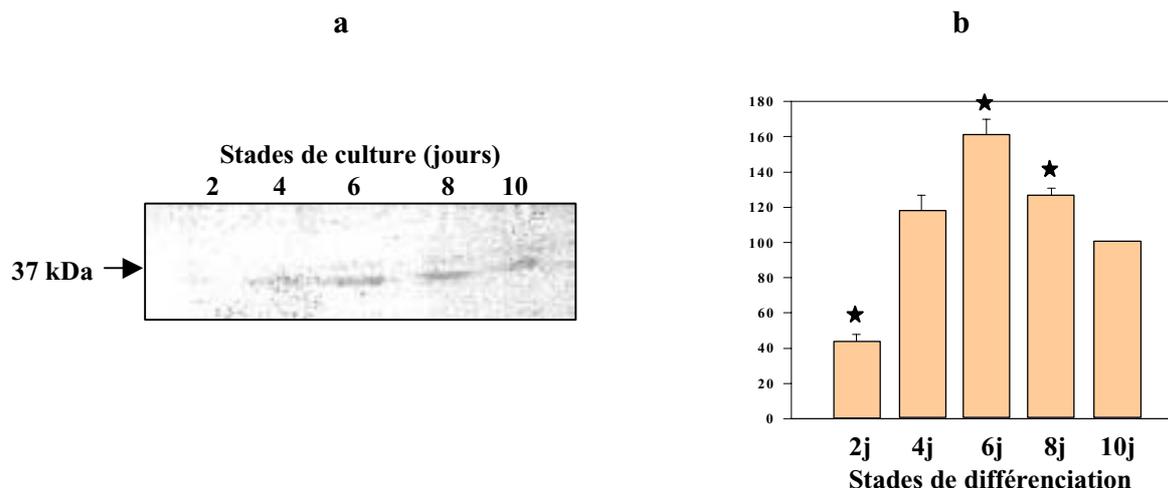


Figure 30 : *Evolution quantitative de la myogénine au cours de la différenciation musculaire*

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéines) à différents stades de différenciation sont soumis à une SDS-PAGE puis transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la myogénine (dilution 1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue au stade 10 j. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

★ Différence significative par rapport au stade pris arbitrairement comme témoin ($p < 0,05$).

Le niveau d'expression de MyoD reste constant tout au long du processus de différenciation (Figure 29 A). Au contraire, les protéines Myf-5 et myogénine semblent subir une régulation de leur taux d'expression en fonction du stade observé. La quantité de Myf-5 subit une forte augmentation au jour 4, puis diminue de façon significative pour se maintenir au même niveau jusqu'au dixième jour (Figure 29 B). La myogénine, elle, tout d'abord faiblement exprimée au deuxième jour, voit son niveau augmenter jusqu'au stade 6 jours, puis diminuer ensuite progressivement (Figure 30). Nous avons pris arbitrairement comme témoin pour chacune de ces expériences le stade qui nous permettait d'obtenir une représentation graphique convenable, les variations enregistrées étant proportionnelles quel que soit le témoin adopté.

Le profil d'expression de la protéine MRF4 n'est pas présenté ici car les expériences menées n'ont pas permis de la détecter. Ce facteur myogénique interviendrait dans les processus plus tardifs de la différenciation, et serait exprimé seulement dans les fibres musculaires adultes (Rawls et al. (395)).

Les profils d'expression obtenus pour les facteurs myogéniques au cours du processus de différenciation musculaire dans la lignée cellulaire C2C12 corroborent les données bibliographiques existant sur d'autres types cellulaires. En effet, il a été montré que Myf-5 et MyoD sont présents dès le début de la différenciation et qu'ils peuvent se substituer l'un à l'autre au cours du développement musculaire (Rudnicki et *al.* (396)) ; ils sont nécessaires à la fois à la détermination et à la survie des myoblastes. Une simple mutation du gène de MyoD ou de Myf-5 n'entraîne pas d'altérations majeures au niveau du développement musculaire alors que les souris doubles mutantes pour ces deux facteurs meurent à la naissance et sont totalement dépourvues de myoblastes et de muscle squelettique.

L'absence de gène codant pour la myogénine chez des souris entraîne une sévère déficience du muscle squelettique (Hasty et *al.* (397)), preuve du rôle essentiel de cette protéine dans la différenciation terminale des myoblastes en myotubes. Le caractère plus tardif est confirmé par les résultats observés figure 30, où la myogénine atteint son taux maximum à un stade ultérieur par rapport aux autres facteurs myogéniques (6 jours au lieu de 4 jours).

III.2 Evolution de la quantité de certaines protéines du cytosquelette et protéines associées

Le cytosquelette est composé d'un réseau de fibres intracellulaires (microtubules, microfilaments et filaments intermédiaires) qui s'organisent et interagissent les uns par rapport aux autres. Ce réseau de fibres est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la structure et des mouvements cellulaires. De très nombreuses protéines s'ordonnent pour construire cet édifice architectural parfait.

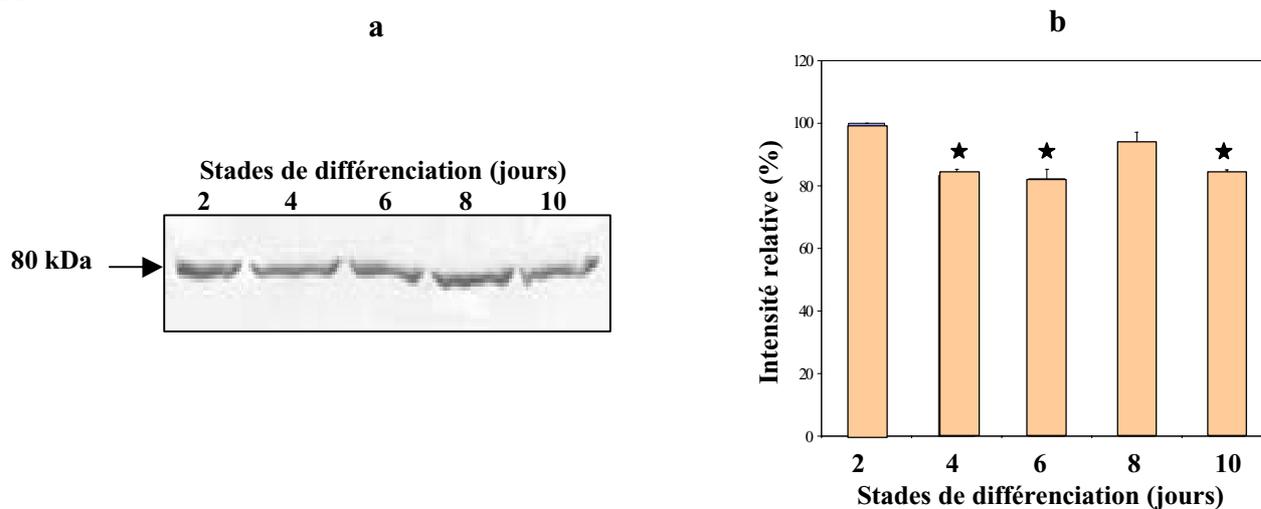
Nous avons été amenés à suivre le devenir d'un certain nombre d'entre elles ainsi que des protéines qui leurs sont associées. Nous avons, dans un premier temps, orienté notre choix vers celles qui étaient connues pour être clivées *in vitro* par les protéases neutres calcium-dépendantes. Suite à nos expériences de surexpression de la μ -calpaine, nous avons observé des variations du niveau d'expression de certaines de ces protéines. Il nous a donc semblé important d'en déterminer l'évolution au cours du processus de différenciation dans la lignée de myoblastes C2C12. Ainsi, les taux d'ezrine, de vimentine et de cavéoline 3 ont été suivis lors de ce phénomène, toutes trois intervenant dans le processus de fusion et le maintien de la structure de la cellule.

Les variations quantitatives de ces trois protéines ont été suivies par immunorévélation au cours de la différenciation musculaire.

La figure 31 montre que la quantité d'**ezrine** diminue à partir du quatrième jour de différenciation (80% de son taux basal) et reste alors relativement stable jusqu'au dixième jour avec toutefois un retour au niveau initial au huitième jour. Le taux de **vimentine** chute progressivement tout au long des stades de différenciation des myoblastes de la lignée C2C12 pour finalement atteindre 70% au dixième jour. Cette protéine est, avec la desmine, un constituant important du réseau de filaments intermédiaires. Elle est également retrouvée dans les cellules mésenchymateuses (fibroblastes et cellules endothéliales des vaisseaux sanguins). Les fibres qui la constituent sont souvent associées aux microtubules et cette association semble contribuer à maintenir en place les divers organites cellulaires ainsi que la structure de la cellule. Elle est exprimée tout au long de la myogenèse ; toutefois, Pieper et *al.* (398) ont mis en évidence, lors de la différenciation de la lignée cellulaire C2C12, une forte diminution de son expression.

Il existe trois types de **cavéolines** : 1, 2 et 3. Les cavéolines 1 et 2 sont ubiquitaires, généralement présentes dans un même tissu, la cavéoline 1 étant la plus abondante. La cavéoline 3 est présente dans tous les types de cellules musculaires et est impliquée dans le développement de dystrophies musculaires chez l'Homme : une sous-expression de son taux est notée dans la LGMD 1 C (Limb-Girdle Muscular Dystrophy) tandis que la DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) serait consécutive à une surexpression de cette protéine (Galbiati et *al.* (399)). Au cours du processus de différenciation musculaire, la cavéoline 3 apparaît brutalement entre les jours 4 et 6 puis reste constante jusqu'au dixième jour de culture (Figure 32). Ces résultats sont en accord avec ceux de Galbiati et *al.* (400) qui montrent que cette protéine est impliquée dans la différenciation des myoblastes et la formation des myotubes. Tang et *al.* (401) et Song et *al.* (402) ont de plus montré que les ARNm de la cavéoline 3 et son produit d'expression protéique sont induits lors de la différenciation des myoblastes de la lignée C2C12.

A



B

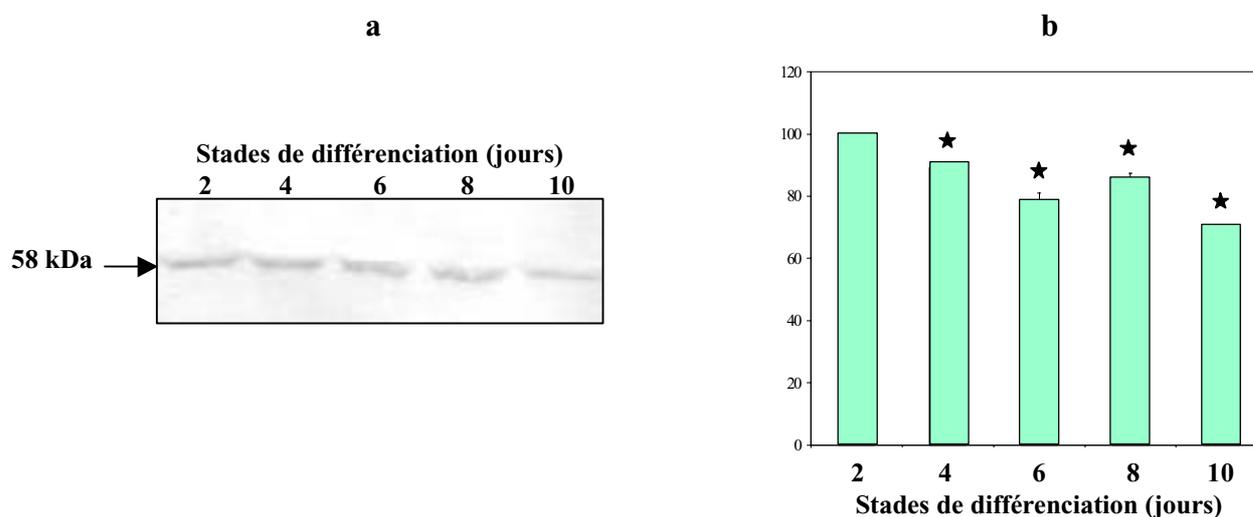


Figure 31 : *Evolution quantitative de l'ezrine (A) et de la vimentine (B) au cours de la différenciation musculaire*

Des extraits cellulaires (100 µg de protéine) à différents stades de différenciation sont soumis à une SDS-PAGE puis transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre l'ezrine (dilution 1/500) et la vimentine (dilution 1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélations

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue au stade 10 j. Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

★Différence significative par rapport au stade pris arbitrairement comme témoin (p < 0,05).

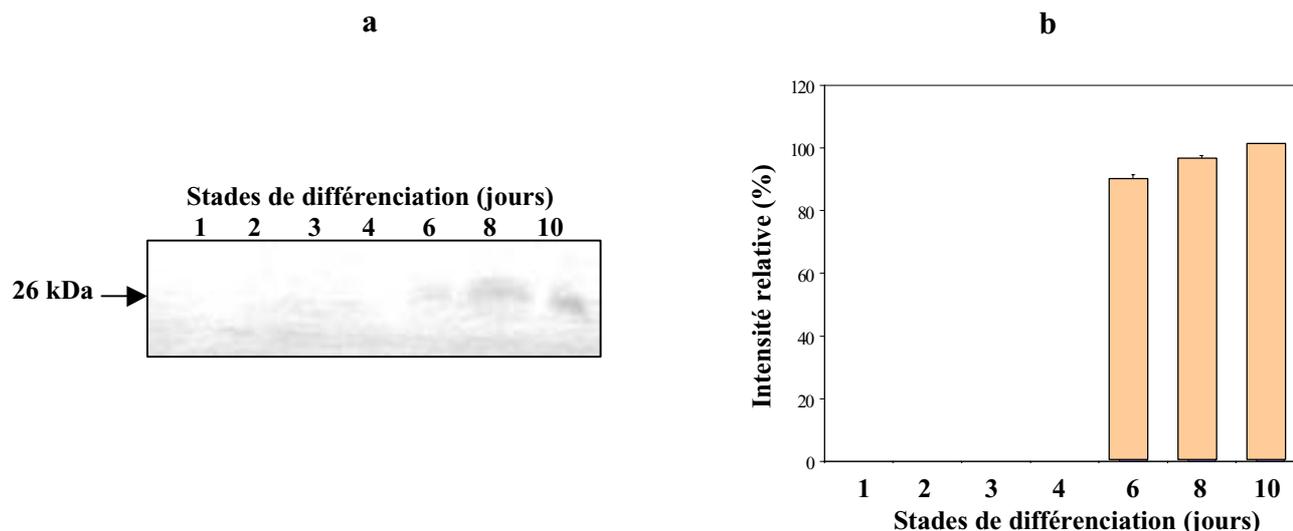


Figure 32 : *Evolution quantitative de la cavéoline 3 au cours de la différenciation musculaire*

Des extraits cellulaires (100 µg de protéine) à différents stades de différenciation sont soumis à une SDS-PAGE puis transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la cavéoline 3 (dilution 1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue au stade 10 j. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

Les résultats rapportés dans cette première partie nous ont permis de caractériser le modèle cellulaire que nous avons choisi d'utiliser dans cette étude : la lignée de myoblastes de souris C2C12.

La fusion représentée figure 21 indique que ce phénomène débute deux jours après l'induction de la différenciation et que sa vitesse augmente jusqu'au huitième jour. A ce stade, environ 60% des noyaux sont dans les myotubes.

Les quantités relatives des ARNm et des protéines μ - et m-calpaines restent relativement inchangées quel que soit le stade de différenciation. En ce qui concerne la p94, alors que son taux protéique n'évolue pas, la quantité des ARNm codant pour l'enzyme augmente de façon corrélée à la différenciation. La quantité relative de calpastatine augmente significativement au moment où la vitesse de fusion ralentit. L'inhibition de

l'activité protéolytique calcium-dépendante, propice à la fusion des myoblastes, pourrait s'avérer nécessaire une fois le processus achevé.

En ce qui concerne les facteurs de transcription myogéniques, alors que le taux de MyoD ne semble pas varier, Myf-5 et la myogénine subissent des variations quantitatives en fonction du stade de différenciation. Myf-5 est majoritairement exprimé au moment où la fusion est la plus intense alors que pour la myogénine le maximum d'expression est observé au stade correspondant à la fin du processus. Ces deux facteurs de régulation myogéniques semblent donc intervenir à des stades différents de la différenciation musculaire.

Les protéines du cytosquelette dont nous avons regardé l'évolution au cours de la différenciation musculaire subissent également des fluctuations au cours de ce processus. L'ezrine voit son taux atteindre 80% à partir du quatrième jour de la mise en différenciation puis reste relativement stable, le niveau de la vimentine diminuant progressivement jusqu'au dixième jour où il n'est plus qu'à 70% de son taux basal. La cavéoline 3 apparaît de façon brutale au sixième jour de différenciation et reste constante jusqu'à la fin du processus. Sachant que cette protéine est spécifique du muscle, elle a fait l'objet de toute notre attention dans notre étude par rapport à la cavéoline 1 qui est ubiquitaire.

2^{ème} partie

MISE EN PLACE DES SYSTEMES DE SUREXPRESSON DE LA μ -CALPAINE

Afin de surexprimer de façon inductible la μ -calpaine et ceci dans le but de mieux cerner son rôle biologique au cours de la myogenèse, nous avons été amenés à utiliser deux types de systèmes d'expression eucaryote : *le LacSwitch II* et le *Tet-Regulated Expression System*.

Le mode de fonctionnement de ces deux systèmes est très distinct ; dans le premier cas, l'addition d'IPTG active la transcription du gène cloné, dans le second cas, c'est la substitution de la doxycycline qui entraîne l'induction du système (cf. Matériel et méthodes).

I - CONSTRUCTION DES VECTEURS DE SUREXPRESSON ET VERIFICATION DE L'INTEGRATION APRES TRANSFECTION DES MYOBLASTES

I.1. Construction des vecteurs et cartographie de restriction

L'ADNc de la sous-unité catalytique (80 kDa) de la μ -calpaine a été sous-cloné dans le sens 5'→3' au niveau du site multiple de clonage des vecteurs d'expression pOPRSVI/MCS et pTet-Splice des systèmes LacSwitch II et Tet-Regulated Expression System. Rappelons que cette sous-unité, codée par deux gènes distincts, est contrairement à la sous-unité régulatrice, spécifique de chacune des isoformes μ - et m-calpaines (Wheelock (403)). De plus, plusieurs études dont celle de Yoshizawa et *al.* (404), ont mis en évidence que cette sous-unité possédait à elle seule une activité protéolytique.

L'ADNc codant pour la sous-unité catalytique de la μ -calpaine humaine nous a été donné par le Professeur Sorimachi, Department of Molecular Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japon. Cet ADNc était cloné dans le vecteur PUC-8 au niveau du site de restriction *EcoR* I.

I.1.1 Système LacSwitch II

Le sous-clonage dans le vecteur pOPRSVI/MCS a nécessité l'utilisation d'un vecteur intermédiaire, le pGEM-7Zf(+). En effet, outre le site de restriction *EcoR* I au niveau du site multiple de clonage du vecteur, la présence d'autres séquences reconnues par cette enzyme a été détectée.

L'ADNc de la μ -calpaine (3011 pb) a donc été, dans un premier temps, cloné en *EcoR* I dans ce dernier vecteur puis, dans un second temps, placé dans le vecteur pOPRSVI/MCS (5647 pb) entre les sites *Cla* I et *Xho* I (cf. Matériel et méthodes).

Les colonies bactériennes possédant le vecteur recombinant pOPRSVI/MCS - μ -calpaine, obtenues après transformation avec le produit de ligation, ont été sélectionnées par PCR après amplification d'un fragment de 152 pb spécifique de la μ -calpaine humaine. La nature de l'amplification a été vérifiée par digestion enzymatique conduisant à l'obtention de deux fragments de 115 et 37 pb (Figure 33).

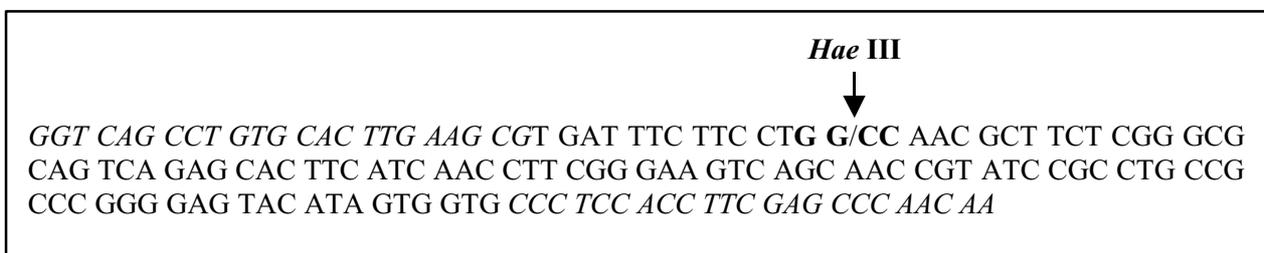


Figure 33: **Séquence nucléotidique du fragment amplifié (152 pb) à partir de l'ADNc de la μ -calpaine**

Les séquences en italique correspondent aux amorces utilisées pour l'amplification enzymatique en chaîne. Le site de restriction *Hae* III est noté en gras.

Par la suite, l'orientation et l'intégrité de l'ADNc cloné dans le vecteur ont été confirmées par carte de restriction (Figure 34) et séquençage.

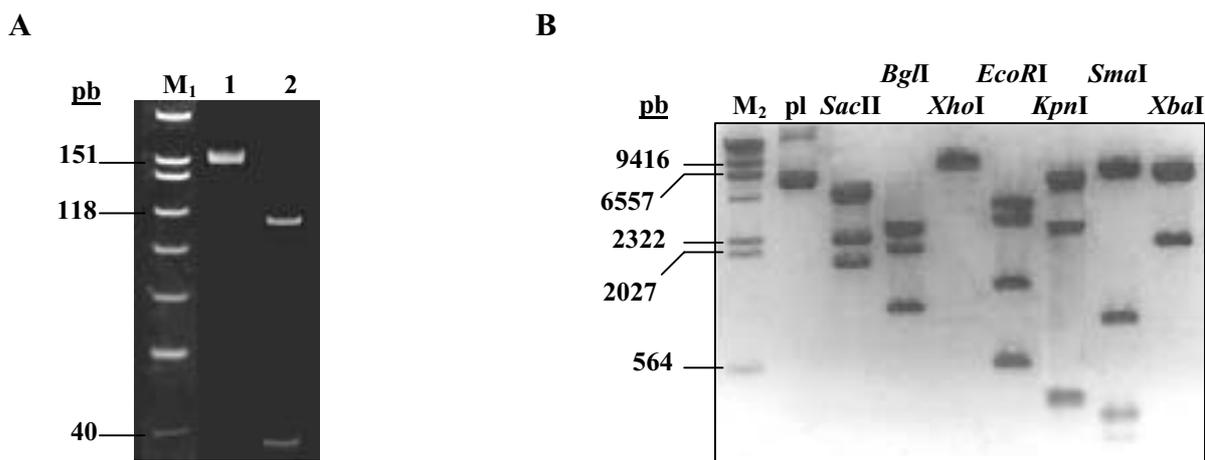


Figure 34 : *Contrôle du vecteur recombinant pOPRSVI/MCS - μ-calpain par PCR (A) et cartographie de restriction (B).*

Les colonies bactériennes obtenues ont été sélectionnées après amplification enzymatique en chaîne et hydrolyse des plasmides par différentes enzymes : *Sac* II, *Bgl* I, *Xho* I, *EcoR* I, *Kpn* I, *Sma* I et *Xba* I.

M₁ : ADN de φX174 hydrolysé par *Hinf* I.

Puits 1 : fragment amplifié (152 pb) de la séquence de la μ-calpain.

Puits 2 : fragment amplifié de la séquence de la μ-calpain puis digéré par *Hae* III.

M₂ : marqueur de haut poids moléculaire lambda *Hind* III.

Puits pl : plasmide non digéré

Au vu de ces résultats, il apparaît donc que le vecteur recombinant possède effectivement la séquence de la μ-calpain au niveau du site de clonage et que son orientation dans le vecteur est correcte.

I.1.2 Système Tet-Regulated Expression System

L'ADNc de la μ-calpain humaine cloné dans le vecteur PUC-8 a directement été sous-cloné dans le vecteur pTet-Splice au niveau du site de restriction *EcoR* I (cf. Matériel et méthodes).

L'identification des clones bactériens recombinants pour le plasmide (contenant l'insert orienté dans le bon sens) a comme précédemment été réalisée par PCR, digestion enzymatique (Figure 35) puis séquençage. Les tailles des fragments amplifiés et des produits d'hydrolyse correspondent à celles attendues.

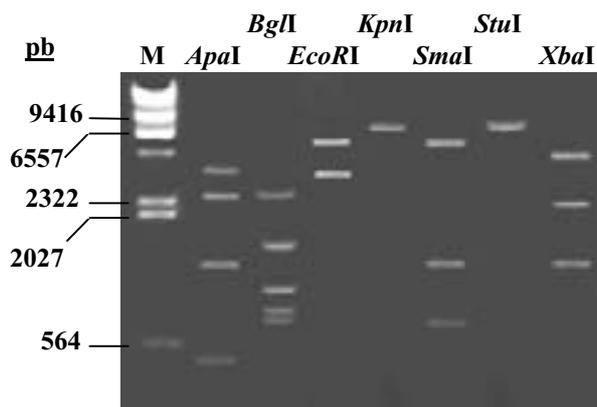


Figure 35 : **Contrôle du vecteur recombinant pTet-Splice - μ -calpaine par cartographie de restriction.**

Le vecteur recombinant a été digéré par différentes enzymes de restriction : *Apa* I, *Bgl* I, *EcoR* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Stu* I et *Xba* I. Les produits obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.
M : marqueur de haut poids moléculaire lambda *Hind* III.

Le vecteur recombinant obtenu détient bien l'insert et celui-ci est orienté dans le sens désiré.

I.2 Contrôle de l'intégration des vecteurs

Les vecteurs des systèmes inductibles LacSwitch II et Tet-Regulated Expression System ont été transfectés de façon stable dans les myoblastes de souris de la lignée C2C12 ; leurs ADN a donc du s'intégrer dans le génome de ces cellules eucaryotes. Les clones cellulaires sélectionnés sont, de plus, ceux qui ont gardé la faculté de se différencier normalement.

I.2.1 Le système LacSwitch II

Rappelons que ce système est composé d'un vecteur opérateur dans lequel a été cloné l'ADNc de la μ -calpaine humaine (pOPRSVI/MCS - μ -calpaine) et d'un vecteur répresseur (pCMVLacI) qui code de façon constitutive pour une protéine répresseur Lac I. La fixation de cette protéine sur des séquences situées dans le promoteur du premier vecteur inhibe la transcription de l'ADN exogène inséré dans le site multiple de clonage du vecteur opérateur. Le traitement par l'IPTG lève cette inhibition (cf. Matériel et méthodes).

Au vu du fonctionnement du système, les myoblastes C2C12 ont été, dans un premier temps, transfectés par le vecteur pCMVLacI ceci pour permettre la synthèse de la protéine répresseur avant l'insertion du vecteur opérateur et donc l'expression continue, constitutive, de l'ARNm de la μ -calpaine.

La sélection des cellules ayant intégré les vecteurs du système a été réalisée par addition d'antibiotiques à la dose létale. Les myoblastes doublement transfectés ne sont pas affectés par ce traitement car ils ont acquis le gène de résistance à l'hygromycine, porté par le vecteur pCMVLacI et celui de la généticine (G418) inclus dans l'ADN du vecteur pOPRSVI/MCS. Ainsi, les myoblastes ont été mis en présence de 650 μ g/ml et 1000 μ g/ml des deux antibiotiques respectivement tout au long des cultures.

I.2.1.1 Vecteur pCMVLacI

Afin de vérifier l'intégration et la fonctionnalité du vecteur répresseur, l'expression des ARNm et de la protéine Lac I a été recherchée. De plus, l'activité répressive de ce vecteur a été testée par transfection transitoire du vecteur pOP13CAT et dosage de l'activité chloramphénicol acétyltransférase (CAT) par ELISA.

Les amorces utilisées pour la RT-PCR, choisies dans la séquence nucléotidique du vecteur pCMVLacI doivent permettre d'amplifier un fragment d'une taille de 878 pb (Figure 36).

Dans le cas de la détection de la protéine Lac I par immunorévélation, les anticorps polyclonaux utilisés (STRATAGENE) devraient permettre de visualiser une bande à 38 kDa.



Figure 36 : *Contrôle de l'expression de l'ARN (A) et de la protéine (B) Lac I dans les myoblastes transfectés par le vecteur répresseur.*

Dans le premier cas, les ADNc spécifiques de Lac I ont été amplifiés (35 cycles) à partir de 10 μ g d'ARN totaux et analysés sur un gel d'agarose (2%).

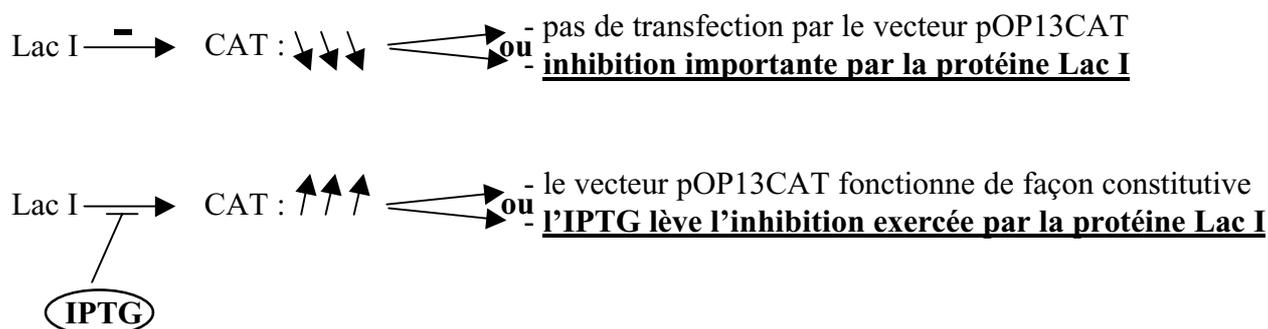
Dans le second cas, des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation a été réalisée en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine répresseur Lac I (dilution 1/1000) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

M : échelle de poids moléculaires (100 pb). Puits 1 à 3 : ADNc amplifiés (A) et protéines (B) correspondant à trois clones de myoblastes (1 et 3, positifs ; 2, négatif) issus de la transfection par le vecteur répresseur.

Comme le montre la figure 36 A, dans seulement deux des trois clones cellulaires présentés ici, le fragment d'ADN de 878 pb caractéristique de l'amplification de Lac I a pu être mis en évidence. Il en est de même pour la protéine Lac I (Figure 36 B).

Parmi tous les clones cellulaires qui se sont révélés être positifs en ARN et protéine, nous avons choisi ceux qui possèdent l'activité répressive la plus importante. Pour ce faire, nous avons transfecté, de façon transitoire, dans les clones précédemment décrits, le vecteur pOP13CAT du système LacSwitch II qui code pour une protéine bactérienne "reporter" facilement détectable, la CAT (chloramphénicol acétyltransférase type I). Ce vecteur fonctionne de la même façon que le vecteur pOPRSVI/MCS : la protéine Lac I inhibe la transcription du gène, inhibition levée lors de l'induction à l'IPTG. Il est alors possible de doser l'activité de la CAT par ELISA (cf. Matériel et méthodes).

Chaque clone est transfecté avec le vecteur pOP13CAT puis, 24h plus tard, traité ou non à l'IPTG, 5 mM ; 6h après l'induction, les échantillons sont extraits.



Les clones sélectionnés pour la transfection du second vecteur pOPRSVI/MCS sont ceux qui possèdent le ratio en concentration CAT traité à l'IPTG/non traité le plus important. Cette détection de l'activité CAT a mis en évidence qu'environ 47% des clones cellulaires qui avaient été préalablement sélectionnés ne possèdent pas l'activité répressive désirée (ratio proche de 0). Seulement 15% des clones testés présentent un fonctionnement du vecteur pCMVLacI correct.

I.2.1.2 Vecteur pOPRSVI/MCS

Le vecteur opérateur du système a été transfecté de façon stable dans quelques-uns des clones cellulaires retenus. Pour chacun des clones, deux types de transfection ont été réalisés :

l'une avec le vecteur pOPRSVI/MCS - μ -calpaine humaine, l'autre avec le pOPRSVI/MCS sans ADNc. Ce dernier servira de contrôle lors de l'induction du système à l'IPTG.

Afin de contrôler l'intégration de chacun de ces deux vecteurs dans le génome des myoblastes, une amplification enzymatique en chaîne a été effectuée à partir de l'ADN génomique des cellules transfectées.

En ce qui concerne le vecteur opérateur vide pOPRSVI/MCS, les amorces utilisées pour l'amplification ont été choisies de part et d'autre du site multiple de clonage ; elles correspondent aux promoteurs T3 et T7 et vont permettre d'amplifier un fragment de 165 pb. Afin de confirmer la nature du produit amplifié, une digestion par l'enzyme de restriction *Sac* I, dont le site est localisé dans le site multiple de clonage, a été réalisée. Le fragment de 165 pb issu de l'amplification devrait donner après hydrolyse deux fragments de 135 et 30 pb (Figure 37).

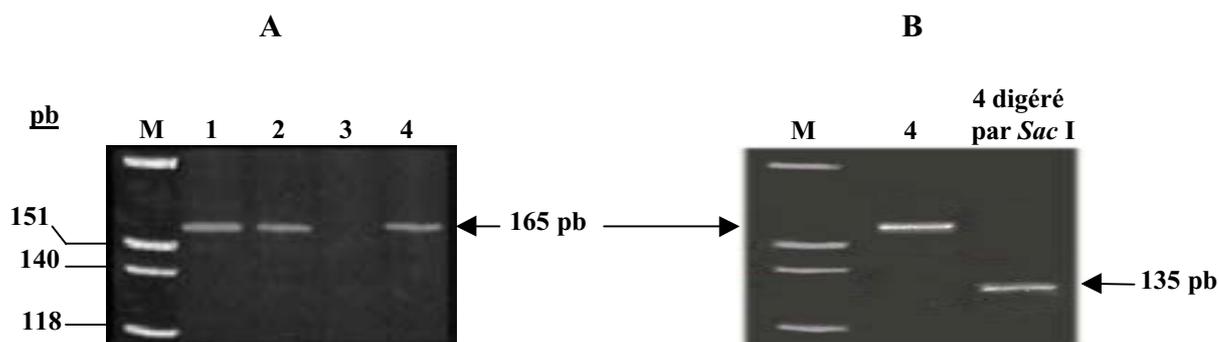


Figure 37 : *Identification de la séquence amplifiée correspondant au site multiple de clonage (MCS) du vecteur pOPRSVI/MCS.*

L'ADN génomique (5 μ g) extrait des myoblastes transfectés a été amplifié pendant 35 cycles et analysé sur un gel de polyacrylamide (10% (p/v)) puis révélé au bromure d'éthidium. L'ADN du vecteur purifié (1 μ g) a été amplifié et analysé dans les mêmes conditions.

Puits M : ADN de ϕ X 174 hydrolysé par *Hinf*I.

Puits 1 (A) : ADN spécifique du "MCS" amplifié à partir du vecteur purifié.

Puits 2-4 (A) : ADN spécifique du "MCS" amplifié à partir de l'ADN génomique de 4 clones cellulaires différents (2 et 4, positifs ; 3, négatif).

Puits 4 (B) : ADN spécifique du "MCS" amplifié à partir de l'ADN génomique et digéré par *Sac* I.

La taille du fragment amplifié correspond bien à celle attendue. L'analyse des produits issus de l'hydrolyse par *Sac* I confirme aussi la nature de la séquence "MCS".

Il apparaît donc que le clone de myoblastes testé dans cette expérience a bien intégré le système LacSwitch II dans son ADN génomique. Ce clone sera utilisé par la suite comme témoin. Il est à noter que la transfection du vecteur pOPRSVI/MCS n'a nullement affecté la capacité des myoblastes à se différencier.

En ce qui concerne le contrôle de l'intégration du vecteur recombinant pOPRSVI/MCS - μ -calpaine humaine par PCR, l'une des amorces est spécifique de l'ADN du vecteur pOPRSVI/MCS (T3 ou T7), l'autre est située sur la séquence de la μ -calpaine clonée au niveau du site multiple de clonage. Etant donné la taille de l'ADNc (3011 pb), deux amorces spécifiques de la μ -calpaine ont été utilisées pour amplifier chaque bout de la séquence (cf. Matériel et méthodes). Il est à noter que les amorces utilisées ici sont spécifiques de la μ -calpaine humaine et n'amplifient pas l'ADN de cette protéase qui est exprimée de façon endogène dans les myoblastes de souris. L'utilisation des couples d'amorces T7/ μ -calpaine humaine 1 et T3/ μ -calpaine humaine 2 devrait permettre de mettre respectivement en évidence des fragments de 280 et 204 pb, fragments dont la spécificité est confirmée par digestion enzymatique (Figure 38).

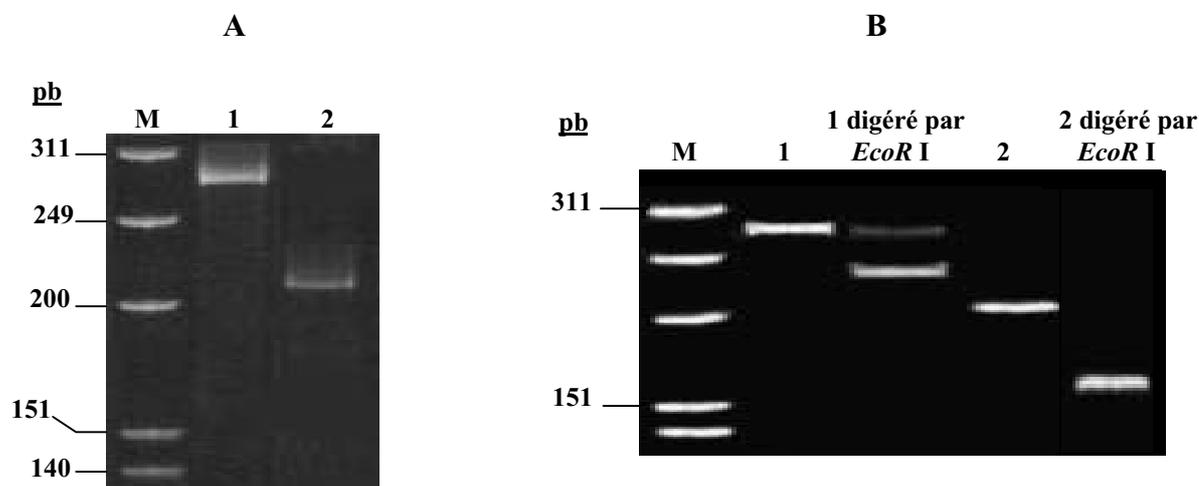


Figure 38 : **Contrôle de l'intégration de l'ADNc de la μ -calpaine humaine dans le génome des myoblastes de la lignée C2C12 par PCR.**

L'ADN génomique (5 μ g) extrait des myoblastes transfectés a été amplifié pendant 35 cycles et analysé sur un gel de polyacrylamide (8% (p/v)) puis révélé au bromure d'éthidium.

M : ADN de ϕ X 174 hydrolysé par *Hinf*I.

Puits 1 : ADN amplifié à partir des amorces T7/ μ -calpaine humaine 1, spécifique d'une séquence de la μ -calpaine humaine.

Puits 2 : ADN amplifié à partir des amorces T3/ μ -calpaine humaine 2, spécifique d'une séquence de la μ -calpaine humaine.

La taille des fragments amplifiés par PCR puis digérés par *EcoR* I correspond bien à celle prévue.

Afin de s'assurer de la nature exacte de l'ADN issu de la PCR, une expérience de Southern-blot a été réalisée. Pour cela, les ADN amplifiés et séparés sur gel d'agarose ont été transférés sur une membrane de nylon et révélés à l'aide d'une sonde. Cette sonde correspond à l'amorce de PCR qui a permis d'amplifier la séquence amont de la μ -calpaine humaine (Figure 39).

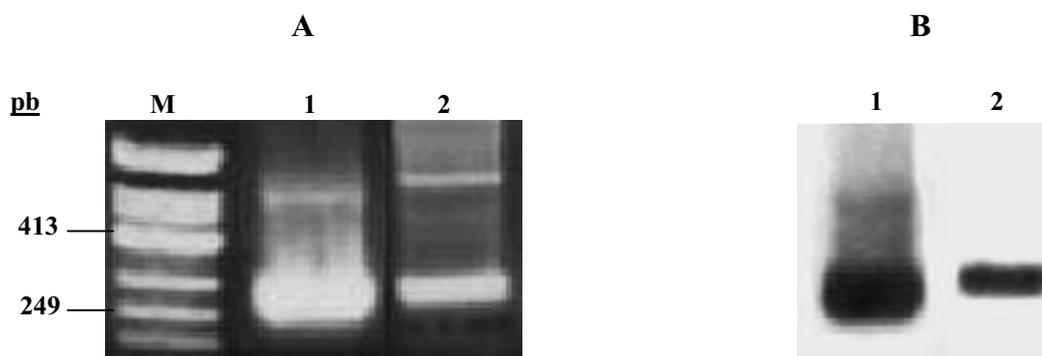


Figure 39 : *Identification par Southern-blot de la séquence de la μ -calpaine.*

L'ADN génomique (5 μ g) extrait des myoblastes transfectés a été amplifié pendant 35 cycles et analysé sur gel d'agarose (2%) (A), transféré sur membrane de nylon et révélé par Southern-blot à l'aide d'une sonde " μ -calpaine 1" (B). L'ADN du vecteur purifié (témoin) a été analysé dans les mêmes conditions.

M : ADN de ϕ X 174 hydrolysé par *Hinf*I (marqueur).

Puits 1 : ADN témoin spécifique d'une partie de la séquence de la μ -calpaine, amplifié à partir du vecteur purifié.

Puits 2 : ADN spécifique d'une partie de la séquence de la μ -calpaine, amplifié à partir de l'ADN génomique.

Les signaux observés sur les membranes, après révélation des complexes acides nucléiques-sonde par chimioluminescence (Figure 39 B), montrent que les produits amplifiés par PCR correspondent bien à ceux attendus.

En conclusion, nous pouvons considérer au vu des contrôles réalisés, que les myoblastes de la lignée C2C12 ont effectivement intégré l'ensemble du vecteur LacSwitch II et que celui-ci est opérationnel.

1.2.2 Le système Tet-Regulated Expression System

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les myoblastes de la lignée C2C12 ont été co-transfectés avec les vecteurs du système Tet (pTet-tTAK et pTet-Splice- μ -calpaine) et le vecteur de sélection pcDNA3.1/Hygro (cf. Matériel et méthodes). Rappelons brièvement que lorsque la protéine tTA, produite de façon constitutive par le vecteur pTet-tTAK, se fixe sur la séquence régulatrice présente en amont de l'ADNc cloné dans le vecteur pTet-Splice, la transcription du gène est activée. En présence de tétracycline ou d'un représentant de la même famille comme la doxycycline, cette transcription est inhibée ; le fait de la retirer du milieu de culture inverse la situation.

Les clones cellulaires résistants à une dose létale d'hygromycine (650 μ g/ml) ont été sélectionnés ; ils doivent normalement avoir intégré dans leur génome les deux vecteurs du système inductible. La vérification de l'intégration de ces deux derniers a donc dû être effectuée.

En ce qui concerne le vecteur pTet-tTAK, sa capacité à induire la transcription d'un gène cible cloné a été testée. Le vecteur pUHC13-3 du système Tet, contenant le gène de la luciférase et fonctionnant sur le même principe que le vecteur pTet-Splice a été transfecté de façon transitoire dans les clones cellulaires retenus. Un témoin non transfecté a été utilisé. L'activité luciférase a été dosée par chimiluminescence. Par la suite, les clones qui se sont révélés être positifs pour ce test ont été traités ou non avec de la doxycycline puis l'activité dosée de nouveau.

La vérification de l'intégration du vecteur pTet-Splice- μ -calpaine a été réalisée par PCR puis Southern-blot à partir de l'ADN génomique des cellules transfectées. Parallèlement, d'autres clones ont été co-transfectés avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice vide.

Pour le vecteur vide, les amorces d'amplification (pTet-Splice amont/pTet-Splice aval) ont été choisies de part et d'autre du site multiple de clonage. La spécificité du fragment de 450 pb obtenu est révélée après digestion enzymatique par *Bgl* I pour donner des fragments de 185 et 255 pb.

Pour le vecteur recombinant pTet-Splice- μ -calpaine, les amorces précédemment citées ont été utilisées en combinaison avec celles retenues à chacune des extrémités de la séquence ADN

de la sous-unité catalytique de la μ -calpaine humaine (μ -calpaine humaine 1 et μ -calpaine humaine 2). Des amplifias de 432 et 350 pb ont été obtenus puis hydrolysés par *EcoR* I pour donner respectivement des fragments de 200 et 232 pb ainsi que deux fragments de 175 pb (Figure 40).

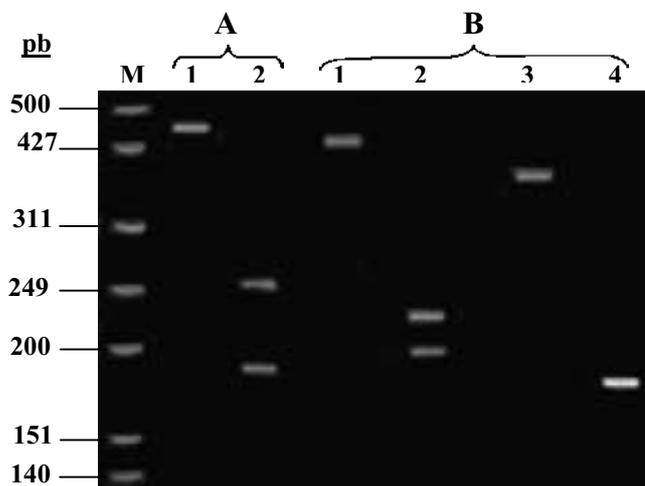


Figure 40 : *Contrôle de l'intégration de l'ADNc de la μ -calpaine humaine dans le génome des myoblastes de la lignée C2C12 par PCR.*

L'ADN génomique (5 μ g) extrait des myoblastes transfectés a été amplifié pendant 35 cycles et analysé sur un gel de polyacrylamide (8% (p/v)) puis révélé au bromure d'éthidium.

M : ADN de ϕ X 174 hydrolysé par *Hinf* I.

A : ADN du vecteur pTet-Splice vide amplifié à partir des amorces pTet-Splice amont/pTet-Splice aval (1) puis digéré par l'enzyme de restriction *Bgl* I (2).

B : ADN du vecteur pTet-Splice- μ -calpaine amplifié à partir des amorces pTet-Splice amont/ μ -calpaine humaine 1 (1) et pTet-Splice aval/ μ -calpaine humaine 2 (3) et hydrolysé par *EcoR* I (2 et 4).

De la même façon que pour le système LacSwitch II, un Southern-blot a été réalisé pour confirmer la nature des fragments amplifiés par PCR. Les signaux obtenus attestent que les amplifias correspondent bien à ceux attendus.

En conclusion, les myoblastes de la lignée C2C12 ont donc effectivement intégré l'ensemble des vecteurs du système Tet-Regulated Expression System, celui-ci étant prêt à fonctionner.

II - INDUCTION DES SYSTEMES ET EFFET DU TRAITEMENT SUR L'EXPRESSION DE LA μ -CALPAINE

II.1 Induction des systèmes

Une grande part de l'originalité de ce travail réside dans l'utilisation des systèmes LacSwitch II et Tet-Regulated Expression System. Leur fonctionnement permet de faire synthétiser de façon inductible, par les cellules eucaryotes, un ADN exogène cloné dans un des vecteurs d'expression.

Rappelons que, à l'état basal, les vecteurs pCMVLacI et pTet-tTAK codent de façon constitutive pour une protéine (Lac I et tTA respectivement) qui se fixe sur des séquences opératrices du vecteur d'expression. Dans le premier cas, cette fixation entraîne l'inhibition de la transcription de l'ADN cloné, le système pouvant être "déréprimé" par addition d'un β galactoside tel que le β -D-thiogalactoside (IPTG) (Hu et Davidson (405)). Dans le second cas, l'addition de tétracycline ou d'un de ses analogues structuraux empêche la fixation de la protéine sur sa cible moléculaire ; le gène cloné reste donc silencieux. La suppression de l'antibiotique génère une situation inverse : la transcription de la séquence nucléotidique exogène peut avoir lieu normalement.

La différenciation des cellules doublement transfectées par les vecteurs des deux systèmes est réalisée en milieu de culture classique. Cependant, pendant la phase de prolifération, le milieu de croissance est additionné d'insuline bovine 10^{-6} M (BOEHRINGER MANHEIM) et des antibiotiques de sélection (hygromycine et/ou généticine) à la dose létale déterminée. Les clones cellulaires retenus pour cette phase sont ceux qui ont gardé, après transfection, la capacité de se différencier normalement.

Dans les chapitres précédents, les différentes étapes de construction des vecteurs recombinants ainsi que l'intégration des vecteurs des systèmes LacSwitch II et Tet-Regulated Expression System ont été vérifiées. A ce stade de nos expérimentations, les cellules de la lignée C2C12 peuvent donc être induites.

Afin de vérifier l'efficacité de la surexpression de la μ -calpaïne, le niveau d'expression de la protéase a été déterminé par RT-PCR semi-quantitative, Western-blot et dosage d'activité enzymatique après purification par chromatographie.

II.2 Système LacSwitch II

D'après les expériences déjà menées au sein du laboratoire sur des cultures primaires de myoblastes de rat, la μ -calpaine jouerait un rôle au cours du processus de différenciation tardive (Poussard et *al.* (406), Cottin et *al.* (407)). Afin de nous placer dans des conditions similaires, le système a été induit par addition d'IPTG à partir du 4^{ème} jour de différenciation. La vitesse de fusion de ce stade étant la plus rapide de la courbe, les effets que nous pourrions observer à ce moment devraient avoir l'amplitude la plus importante.

Des travaux menés par Wyborski et Short (408) ont permis de caractériser le mode d'action de l'IPTG dans les cellules eucaryotes de mammifères. La pénétration de l'inducteur se fait rapidement (2 à 4 h après l'addition dans le milieu de culture), puis se concentre à l'intérieur des cellules pour atteindre des doses très supérieures à celles obtenues dans le milieu extracellulaire. La dose toxique a été observée pour une concentration s'élevant à 130 mM d'IPTG.

Le système LacSwitch II a été utilisé sur de nombreux types cellulaires (Kaneda et *al.* (409), Stoff et *al.* (410), Mc Connell et *al.* (411)), notamment, sur la lignée cellulaire de myoblastes L8 (Huang et Forsberg (412)) ou C2C12 (Bisbal et *al.* (413), Dargelos et *al.* (414)). Ces études nous ont permis de comparer les concentrations en inducteur utilisées dans chacun des cas : de 1 mM dans les lignées cellulaires tumorales humaines à 5 mM dans les lignées cellulaires myogéniques de rongeurs, les cellules Hela ou les lignées fibroblastiques de souris. Par conséquent, au cours de notre étude, la concentration finale d'IPTG que nous allons appliquer sur nos cellules sera de 5 mM.

Parmi les différentes expériences réalisées à l'aide du système d'expression LacSwitch II, nombreuses concernent la surexpression d'une protéine par synthèse d'un ARN sens. L'effet de l'IPTG a pu être observé 4 h, 8 h, 48 h voire plusieurs jours après l'addition de l'inducteur dans le milieu de culture, selon les cas. Il apparaît que l'induction de la transcription de l'ADN cloné dans le vecteur d'expression peut être rapidement mise en place en présence d'IPTG. Cependant, la quantité de protéine ciblée par ce type de traitement ne varie pas forcément de façon immédiate. Nous avons donc décidé d'observer les effets de l'addition d'IPTG au milieu de culture toutes les 8 heures et cela sur une semaine.

En résumé, les myoblastes C2C12 doublement transfectés ont été mis à différencier (selon les conditions décrites dans le chapitre Matériel et méthodes). Deux jours plus tard, les antibiotiques de sélection (hygromycine et généticine) ont été retirés afin de ne pas interférer avec le traitement. Au bout de 4 jours de différenciation, l'IPTG (5 mM) a été ajouté au milieu de culture. Les échantillons ont été préparés toutes les 8 heures de j1 à j7.

II.2.1 Effet du traitement sur la quantité des ARNm codant pour la μ -calpaine

L'ADNc de la sous-unité catalytique de la μ -calpaine humaine a été cloné dans le vecteur d'expression pOPRSVI/MCS. Suite à l'induction du système, un ARN sens d'environ 3000 pb devrait être synthétisé par la cellule. Les amorces employées ici amplifient la séquence ADN de la μ -calpaine de souris et humaine. Les signaux observés représentent donc la somme de l'expression des ARNm endogènes et exogènes.

L'évaluation du niveau d'expression a été réalisée en co-amplifiant les ARNm de la μ -calpaine et ceux codant pour un gène de ménage dont l'expression est réputée pour ne pas varier au cours du processus de différenciation musculaire dans les cellules C2C12. Cette normalisation est nécessaire à la comparaison des différents stades testés, ce gène servant de témoin interne pour les étapes de transcription inverse et de PCR. Bisbal *et al.* (415) ont mis en évidence que le niveau d'expression de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ne subissait pas de variation au cours de ce processus ; ses ARNm vont donc nous servir de marqueur cellulaire constitutif.

L'amplification enzymatique en chaîne des séquences de la μ -calpaine et de la GAPDH devraient nous permettre d'obtenir des fragments de 152 et 191 pb respectivement. Les conditions de cette co-amplification ont été préalablement déterminées, le nombre de copies des l'ARNm codant pour la GAPDH étant notamment plus important que celui de la μ -calpaine. En conséquence, les amorces permettant l'amplification de la GAPDH ont été ajoutées au milieu réactionnel à la fin du 6^{ème} cycle et leur quantité a été diminuée de moitié. Les produits d'amplification obtenus en fonction du nombre de cycles (dans ces conditions) ont été analysés sur gel de polyacrylamide (Figure 41).

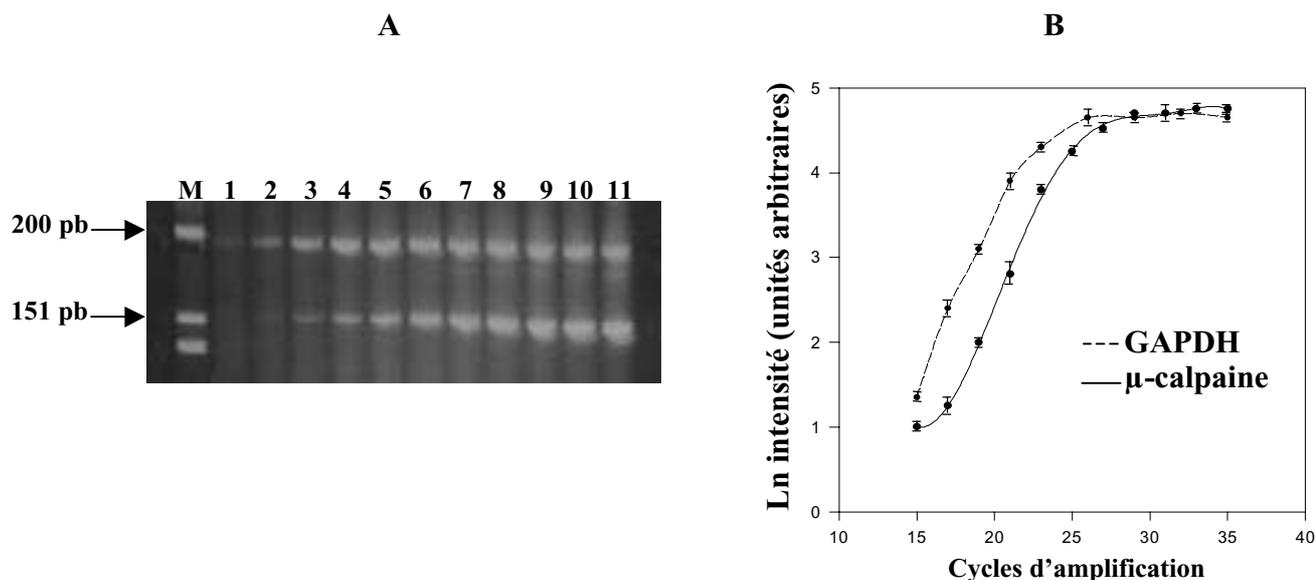


Figure 41: *Analyse électrophorétique de la co-amplification des ADNc de la μ-calpaine et de la GAPDH*

Les ADNc ont été synthétisés à partir de 20 μg d'ARN totaux. Des prélèvements de 10 μl sont effectués après différents cycles d'amplification et analysés sur un gel de polyacrylamide (8%).

A : Profil électrophorétique

Puits M : ADN de φX 174 hydrolysé par *Hinf*I.

Puits 1 à 11 : ADNc co-amplifiés correspondant respectivement aux cycles : 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 et 35.

B : Quantification par vidéo-densitométrie

Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

D'après le profil obtenu figure 41 B, et afin que l'intensité des fragments amplifiés soit suffisamment importante pour être discriminante, le nombre de cycles d'amplification a été fixé à 21.

Dès lors, une quantification relative des ARNm de la μ-calpaine après induction du système peut être réalisée. Afin de s'assurer que le traitement à l'IPTG et/ou la transfection n'ont pas d'effet sur l'expression des ARNm de la μ-calpaine, différents contrôles ont été mis en œuvre : les myoblastes des lignées C2C12 sauvages, ainsi que les cellules transfectées avec les vecteurs répresseur et opérateur vide ont été traités et analysés dans les mêmes conditions que précédemment (Figure 42).

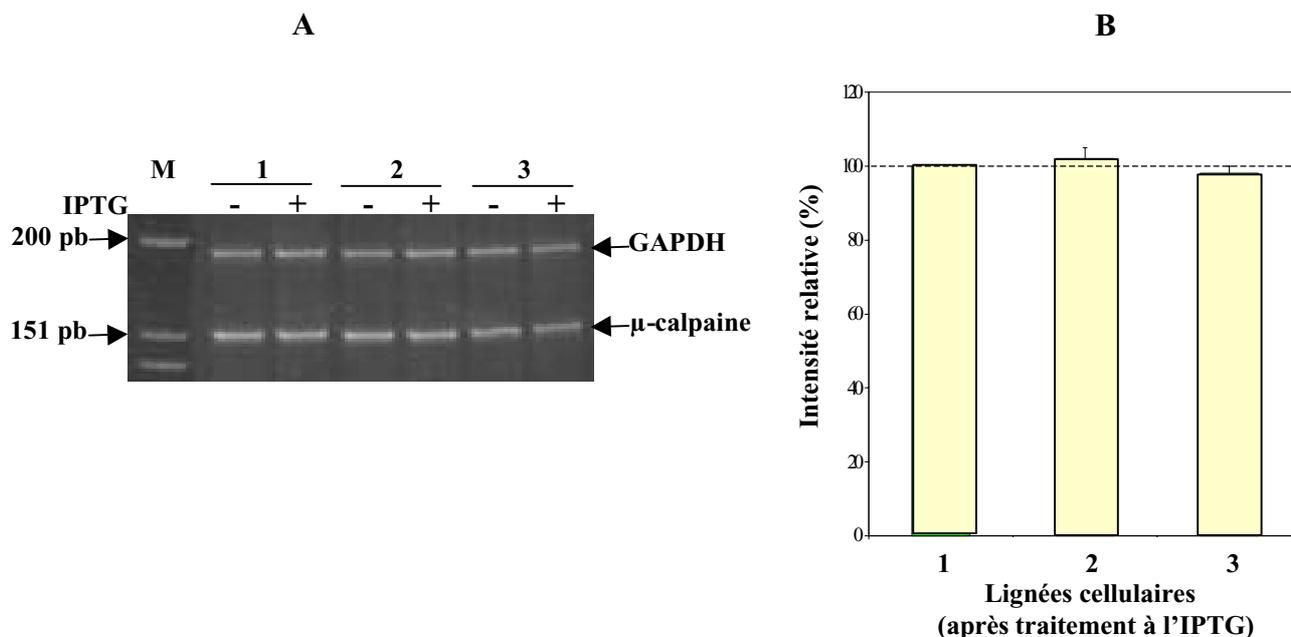


Figure 42 : *Effet de l'addition d'IPTG sur la transcription de la μ -calpaine*

Les myoblastes sont traités après 4 jours de différenciation avec de l'IPTG (5 mM) puis les échantillons cellulaires sont préparés. La quantité d'ARNm est déterminée par transcription inverse (à partir de 20 μ g d'ARN totaux) et amplification enzymatique en chaîne (21 cycles).

A : Profil électrophorétique

M : ADN de ϕ X 174 hydrolysé par *Hinf*I.

Puits 1: C2C12 sauvages, non transfectées.

Puits 2: C2C12 transfectées avec les vecteurs répresseur et opérateur vide

Puits 3: C2C12 transfectées avec les vecteurs répresseur et opérateur contenant l'ADNc de la μ -calpaine humaine.

B : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est quantifiée par rapport à l'étalon interne (GAPDH) et exprimée par rapport à l'intensité du témoin correspondant, représenté schématiquement par la ligne en pointillés. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 4).

Comme le montre la figure 42, la quantité d'ARNm codant pour la μ -calpaine, dans les lignées C2C12 sauvages, C2C12 transfectées avec les vecteurs répresseur et opérateur vide ou contenant l'ADNc de la μ -calpaine humaine, n'est pas influencée par le traitement à l'IPTG. Ceci a été observé sur des échantillons préparés toutes les 8 heures sur une semaine.

L'induction du système à l'IPTG n'entraîne pas de surexpression des ARNm de la μ -calpaine. Deux hypothèses peuvent alors être émises. Soit le système LacSwitch II tel que nous l'utilisons ne fonctionne pas, soit la cellule met en place un moyen de régulation empêchant qu'une enzyme protéolytique, comme la μ -calpaine, puisse être exprimée à un niveau supérieur à son taux normal et ceci pour lutter contre des dégradations anarchiques dans la cellule.

II.2.2 Effet du traitement sur la quantité de protéine

Le niveau d'expression de la protéase a été suivi par immunorévélation toutes les 8 heures sur une semaine après addition d'IPTG dans le milieu de culture. A chaque stade de culture, la même quantité de protéine est analysée. L'anticorps monoclonal anti μ -calpaine utilisé reconnaît à la fois la protéase de souris (endogène dans les C2C12) et l'humaine (exogène, clonée dans le vecteur d'expression).

Comme précédemment, les mêmes témoins ont été utilisés de sorte à voir une possible interférence de l'inducteur ou de la transfection sur les variations du taux de protéine.

Un marqueur protéique, la β -tubuline, dont l'expression est stable dans les cellules C2C12 au cours du processus de différenciation cellulaire a été révélé sur les mêmes échantillons. Ainsi, les signaux obtenus pourront être comparés (Figure 43).

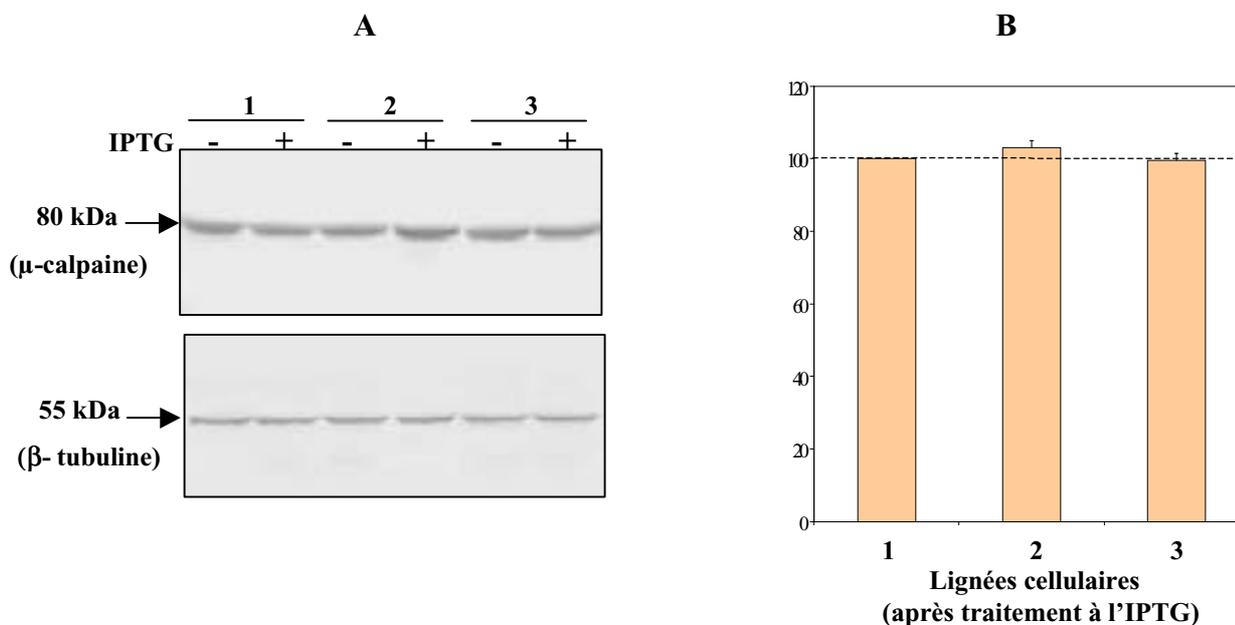


Figure 43 : Effet du traitement à l'IPTG sur la quantité de μ -calpaine

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) réalisés à différents temps après l'addition d'IPTG (5 mM) dans le milieu de culture sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux de la μ -calpaine (80 kDa) (1/1000) et polyclonaux de la β -tubuline (55 kDa) (1/1000) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

A : Immunorévélations

Puits 1 : C2C12 sauvages, non transfectées.

Puits 2 : C2C12 transfectées avec les vecteurs répresseur et opérateur vide.

Puits 3 : C2C12 transfectées avec les vecteurs répresseur et opérateur contenant l'ADNc de la μ -calpaine humaine.

B : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport au témoin correspondant (représenté par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 6).

L'immunorévélation de la μ -calpaine indique que l'induction du système à l'IPTG n'entraîne pas de variation significative du niveau d'expression de la protéase et ceci quels que soient la lignée et le stade testés. Un second anticorps anti μ -calpaine (polyclonal, dilution au 1/1000, provenant d'un sérum de chèvre et réalisé par immunisation à partir de la protéine purifiée) dirigé exclusivement contre la protéase de souris nous a permis d'affirmer que seule la μ -calpaine de souris est révélée sur chaque piste ; elle s'avère stable. La protéase humaine n'est pas exprimée.

Ces résultats attestent de la non efficacité de l'induction du système LacSwitch II sur le taux de μ -calpaine humaine dans les myoblastes transfectés ; aucune surexpression n'est notée.

II.2.3 Effet du traitement sur l'activité enzymatique de la μ -calpaine

Suite à l'induction du système LacSwitch II, nous n'avons pu observer de variation dans le niveau d'expression de la protéine de la μ -calpaine. Ceci nous a conduits à penser que la surexpression attendue pouvait être relativement infime et que seul un dosage de son activité protéolytique, beaucoup plus sensible, pourrait la révéler. Une purification partielle sur chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/5 PHARMACIA BIOTECH) a été nécessaire pour le dosage de l'activité calcium-dépendante du fait de la présence de la calpastatine.

Les conditions expérimentales ont été optimisées afin de séparer la μ -calpaine de la calpastatine (inhibiteur endogène des calpaines), cette dernière étant éluée pour une force ionique très proche de celle nécessaire à la désorption de la μ -calpaine sur une matrice échangeuse d'anions (Koohmaraie et al. (416)).

Après application du gradient en NaCl de 0 à 0,3 M et du saut à 0,5 M en NaCl, les fractions collectées sont testées pour la quantification des activités calpaines. La figure 44 montre un exemple du profil chromatographique obtenu à partir d'un des échantillons testés (C2C12 sauvages). Un profil analogue est obtenu avec les autres lignées cellulaires, quel que soit le stade de différenciation.

Après immunorévélation et dosage de l'activité calcium-dépendante, il s'avère que la μ -calpaine est éluée à une concentration de 0,18 M en NaCl alors que la m-calpaine se retrouve dans des fractions éluées pour une force ionique correspondant au saut à 0,5 M en NaCl (Cottin et al. (417)).

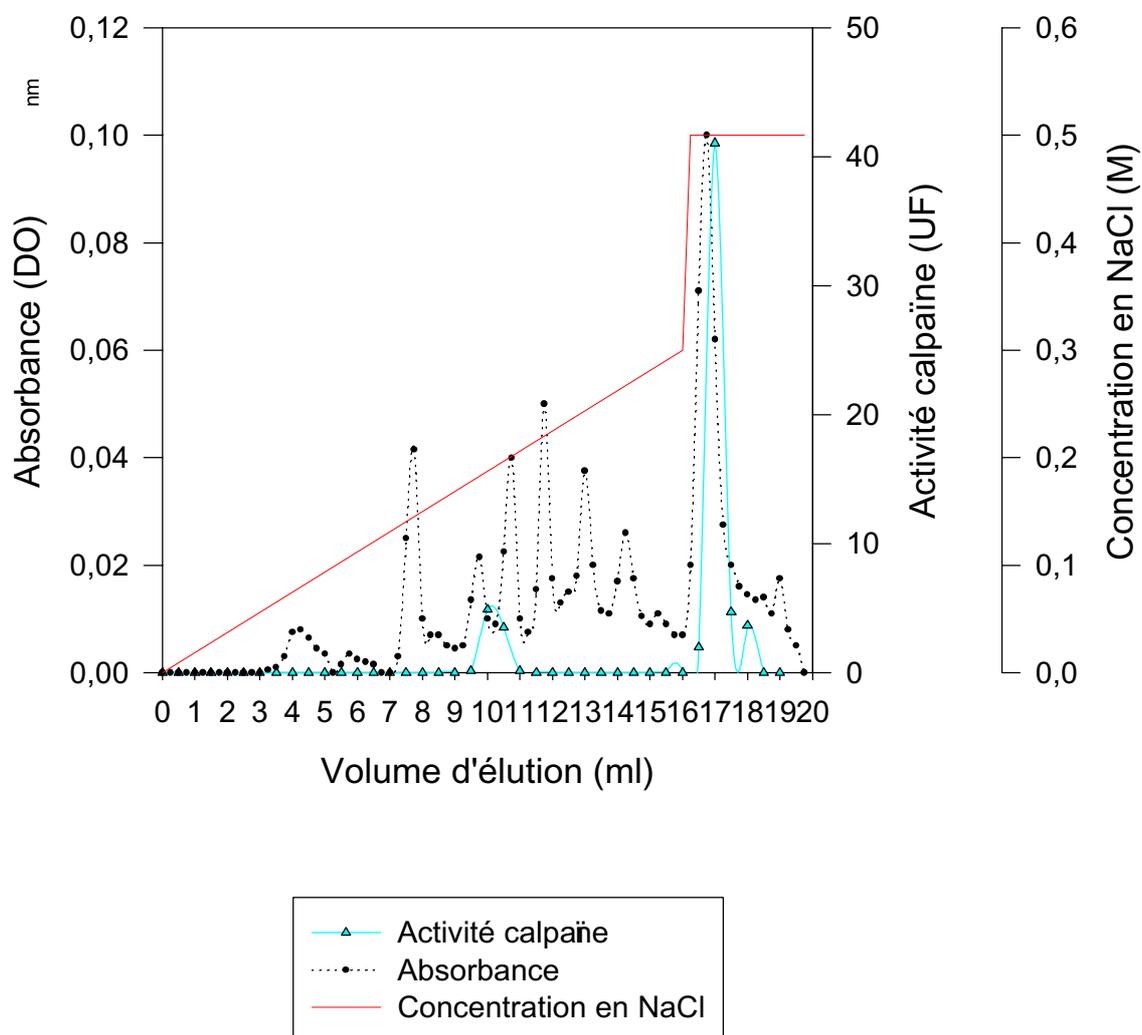


Figure 44 : *Chromatographie échangeuse d'anions sur MonoQ HR 5/5 (système FPLC)*

- colonne : 1 ml
- charge : 4 ml d'échantillon cellulaire (2,5 mg de protéine) sont déposés sur la colonne
- adsorption : tampon A (Tris-HCl 20 mM pH 7,5 contenant EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, DTT 1 mM et NaN_3 1 mM)
- désorption : gradient NaCl de 0 à 0,3 M dans du tampon A et "step" à 0,5 M
- débit : 0,5 ml/min
- volume des fractions : 500 μ l

Pas de différence significative dans l'activité de la μ -calpaine n'est notée dans les C2C12 contenant l'insert humain, qu'elles soient induites ou non à l'IPTG (Figure 45). Les témoins, C2C12 sauvages et myoblastes transfectés avec le vecteur vide, présentent des activités calpaines comparable pour les mêmes fractions.

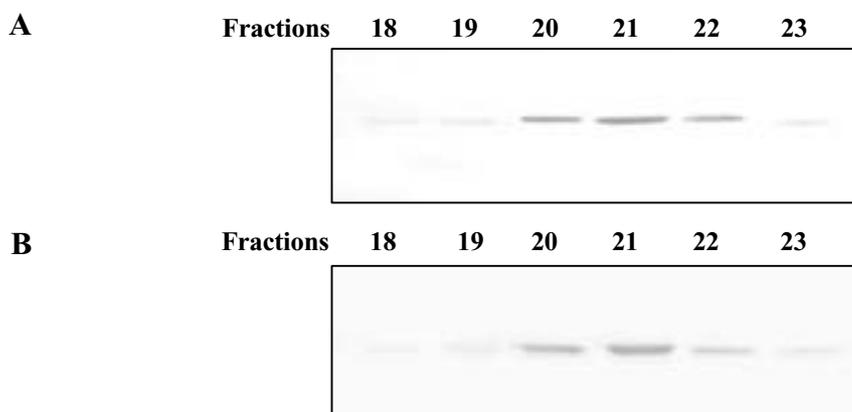


Figure 45 : ***Immunorévélation des fractions éluées après chromatographie FPLC.***

Les myoblastes transfectés avec le vecteur répresseur et opérateur contenant l'ADNc de la μ -calpaine sont traités (A) ou non (B) par l'IPTG puis les protéines qui en sont extraites sont chromatographiées. Les fractions 18 à 23 recueillies sont soumises à une SDS-PAGE et transférées sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux de la μ -calpaine (80 kDa) (1/1000).

En conclusion, l'induction du système LacSwitch II par addition d'IPTG dans le milieu de culture ne nous a pas permis de déceler une quelconque surexpression de la μ -calpaine. Cet état a été observé sur une semaine après extraction des échantillons toutes les 8 heures.

Plusieurs autres tests ont été mis en œuvre de sorte à faire fonctionner ce système et comprendre la(les) raison(s) pour la(les)quelle(s) aucune variation d'expression de la protéase n'a pu être observée.

Nous avons traité plusieurs fois les cellules à l'IPTG pensant à une dégradation rapide de l'inducteur dans le milieu de culture ; extrait les échantillons à des temps plus rapprochés ; transfecté seulement le vecteur opérateur dans lequel nous avons cloné l'ADNc de la grande sous-unité de la protéase sans le vecteur répresseur, pour tenter de voir une expression constitutive de la protéase ; cloné puis transfecté la sous-unité régulatrice de la μ -calpaine (30 kDa) dans les myoblastes qui possédaient déjà l'ensemble du système LacSwitch II, envisageant que cette sous-unité été essentielle à l'expression de la protéase ex vivo ;.... Ces différentes tentatives sont restées infructueuses.

II.3 Système Tet-Regulated Expression System

Dans ce cas, les myoblastes de souris C2C12 sont mis à proliférer et différencier dans un milieu de culture contenant de la doxycycline, analogue stable de la tétracycline. L'induction du système c'est-à-dire la transcription de l'ADNc se fait lorsque l'antibiotique est supprimé.

De la même façon que pour le système LacSwitch II, l'induction est réalisée à partir du 4^{ème} jour de différenciation.

Gossen et Bujard (418) ont montré que la tétracycline était stable, pénétrait rapidement dans la cellule (Héla) et induisait des mouvements transcriptionnels efficaces. 12 heures après le retrait de l'inducteur du milieu de culture, ils obtiennent plus de 80% du maximum de traduction de la protéine recherchée. Inversement, lorsque la tétracycline est ajoutée au milieu, ils notent une inhibition presque totale de l'expression de la protéine en question. Shockett et *al.* (419) ont montré, sur des fibroblastes de la lignée NIH 3T3, que le début de la transcription pouvait commencer 2 à 3 heures après l'induction du système et qu'il variait en fonction du nombre de copies intégrées dans le génome de la cellule et du site d'intégration. Au vu de ces résultats nous avons décidé de suivre les effets de l'induction toutes les 12 heures sur deux jours.

L'IPTG, malgré sa capture rapide et sa stabilité intracellulaire, agit lentement et de façon moins efficace, ce qui se traduit par une induction modérée. Les études réalisées montraient une très importante variabilité concernant le début de la transcription et donc peu d'indices étaient fournis sur le moment où l'ARNm et la protéine pouvaient être exprimés. De plus, l'affinité de l'IPTG pour la protéine répresseur Lac I est inférieure à celle de la tétracycline pour la protéine tTA ($K_a(\text{IPTG}) = 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Barkley et Bourgeois (420)), $K_a(\text{tétracycline}) = 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Takahashi et *al.* (421))), ce qui laisse supposer que la fiabilité du système LacSwitch II à ce niveau est moindre que celle du système Tet.

Les doses d'antibiotique utilisées dans les diverses études réalisées varient pour la plupart entre 0,1 et 0,5 $\mu\text{g/ml}$; elles génèrent alors une induction importante, réversible et sont bien tolérées par la cellule, à tel point que le système peut être utilisé *in vivo* sans effet toxique sur l'animal vivant. Au cours de nos expériences, nous avons utilisé une dose d'un analogue de la tétracycline, la doxycycline, plus stable encore, de sorte que sa concentration finale dans le milieu de culture soit de 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Dans le cadre de notre étude, nous avons observé les effets de l'induction du système Tet par la doxycycline (0,5 µg/ml) toutes les 12 heures et cela sur deux jours.

Les myoblastes C2C12 doublement transfectés ont été donc mis à différencier pendant 4 jours dans un milieu contenant de la doxycycline puis, au 4^{ème} jour, un milieu sans l'inducteur est appliqué sur les cellules. Les extraits cellulaires sont dès lors préparés toutes les 12 heures sur une période de 48 heures.

II.3.1 Effet sur la quantité des ARNm codant pour la μ -calpaine

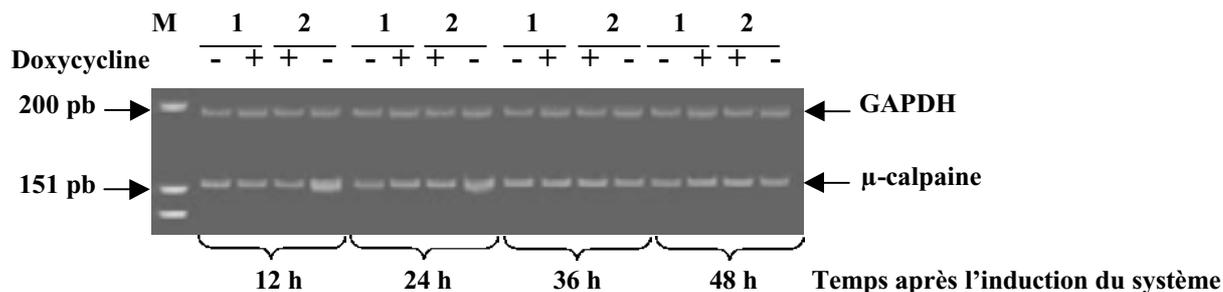
L'évaluation du niveau d'expression a été réalisée en co-amplifiant, par RT-PCR, les ARNm de la μ -calpaine et ceux de la glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH) dont le taux est stable tout au long du phénomène de différenciation musculaire dans les cellules C2C12. Des fragments de 152 et 191 pb ont été obtenus et leurs intensités quantifiées par vidéo-densitométrie (Figure 46). Les signaux correspondent à l'amplification des ARNm endogènes de souris et exogènes produits à partir du vecteur d'expression pTet-Splice- μ -calpaine humaine.

Pour contrôle, les C2C12 sauvages ont été traitées avec de la doxycycline. En effet, il a été mis en évidence que le traitement par cet antibiotique pouvait entraîner des perturbations au niveau de l'expression de certains gènes. Un contrôle supplémentaire avec les myoblastes transfectés avec le vecteur pTet-Splice vide a également été réalisé.

Comme le montre la figure 46, la quantité d'ARNm codant pour la μ -calpaine augmente significativement dès 12 heures après le retrait de la doxycycline du milieu de culture, cette hausse étant de l'ordre de 60 %. Au stade 24 heures, la surexpression observée n'est plus que de 45 % pour disparaître lors des stades 36 et 48 heures.

La comparaison du niveau d'expression des ARNm de la protéase entre les myoblastes sauvages traités et non traités à la doxycycline n'a pas fait apparaître de différence significative. De même, les C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice-vide montrent des taux d'ARNm équivalents et identiques aux précédents. Les variations quantitatives observées ne sont donc pas dues à un effet secondaire de l'inducteur ou de la transfection. Notons enfin que la quantité d'ARNm obtenue dans cette nouvelle lignée est supérieure à celle des myoblastes sauvages.

A



B

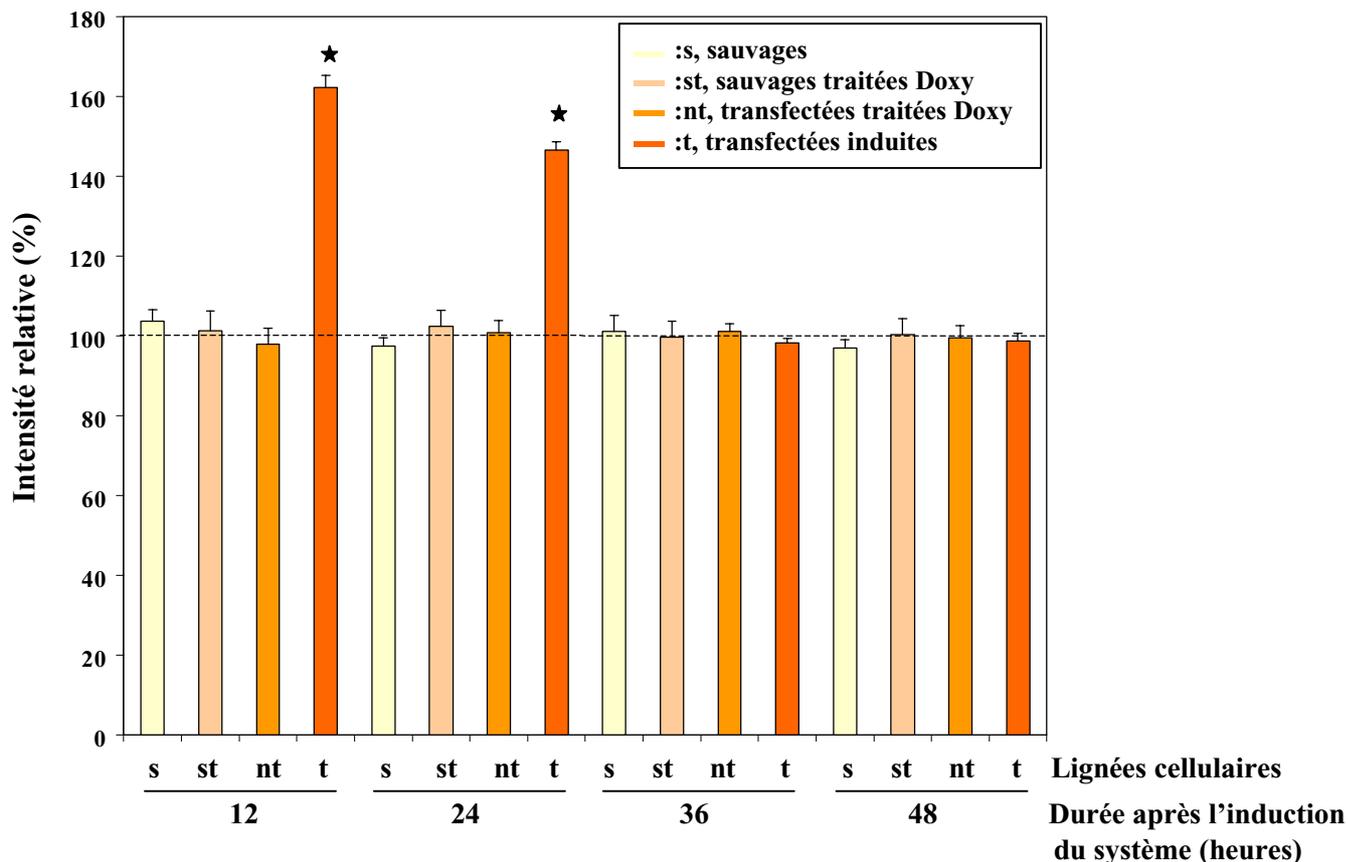


Figure 46 : *Effet de l'induction à la doxycycline sur la transcription de la μ -calpaine*

Les myoblastes sont traités ou non (+, -) à la doxycycline 0,5 μ g/ml après 4 jours de différenciation. Les extraits cellulaires sont préparés 12, 24, 36 et 48h après. La quantité d'ARNm est déterminée par transcription inverse (à partir de 20 μ g d'ARN totaux) et amplification enzymatique en chaîne (21 cycles).

A : Profil électrophorétique

M : ADN de ϕ X 174 hydrolysé par *Hinf*I.

Puits 1: C2C12 sauvages, non transfectées.

Puits 2: C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Slice contenant l'ADNc de la μ -calpaine humaine.

B : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est quantifiée par rapport à l'étalon interne (GAPDH). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 6).

s: C2C12 sauvages; st: C2C12 sauvages traitées à la doxycycline; nt: C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK/pTet-Splice- μ -calpaine humaine, traitées à la doxycycline; t: C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK/pTet-Splice- μ -calpaine humaine et induites après suppression de la doxycycline du milieu de culture.

★ différence significative par rapport au témoin (p < 0,05)

Ces premiers résultats laissent penser à une réelle efficacité de l'induction du système Tet-Regulated Expression System sur la taux d'ARNm de la μ -calpaine dans les myoblastes transfectés.

II.3.2 Effet sur la quantité de protéine

Les variations quantitatives de la μ -calpaine ont été suivies par immunorévélation après action de la doxycycline sur les cellules. A chaque stade de culture, la même quantité de protéine est analysée et révélée avec l'anticorps monoclonal anti μ -calpaine qui reconnaît les espèces murine et humaine.

Les résultats exposés figure 47 montrent une augmentation du niveau d'expression de la μ -calpaine après induction du système dans les C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice contenant l'ADNc de la μ -calpaine humaine. Cette surexpression est mise en évidence 24 heures après la suppression de la doxycycline et se prolonge jusqu'à 36 heures. Les pourcentages de surexpression ont été évalués à 50 et 30 % respectivement. Un retour au taux basal a été observé 48 heures après l'induction du système. L'anticorps polyclonal anti μ -calpaine, dirigé spécifiquement contre la souris, révèle que la quantité de protéine reste stable quelle que soit la lignée cellulaire testée, que les cellules soient induites ou pas ; le taux mis en évidence est le même qu'à l'état basal. Par déduction, nous pouvons donc affirmer que la variation observée est due à l'expression de la μ -calpaine humaine clonée dans le vecteur pTet-Splice.

Aucune différence significative dans le niveau d'expression de la protéase n'a été mise en évidence entre les myoblastes sauvages traités et non traités à la doxycycline. De même, les C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice-*vide* montrent des taux équivalents et identiques aux précédents. Les variations quantitatives observées ne sont donc pas dues à un effet secondaire de l'inducteur ou de la transfection.

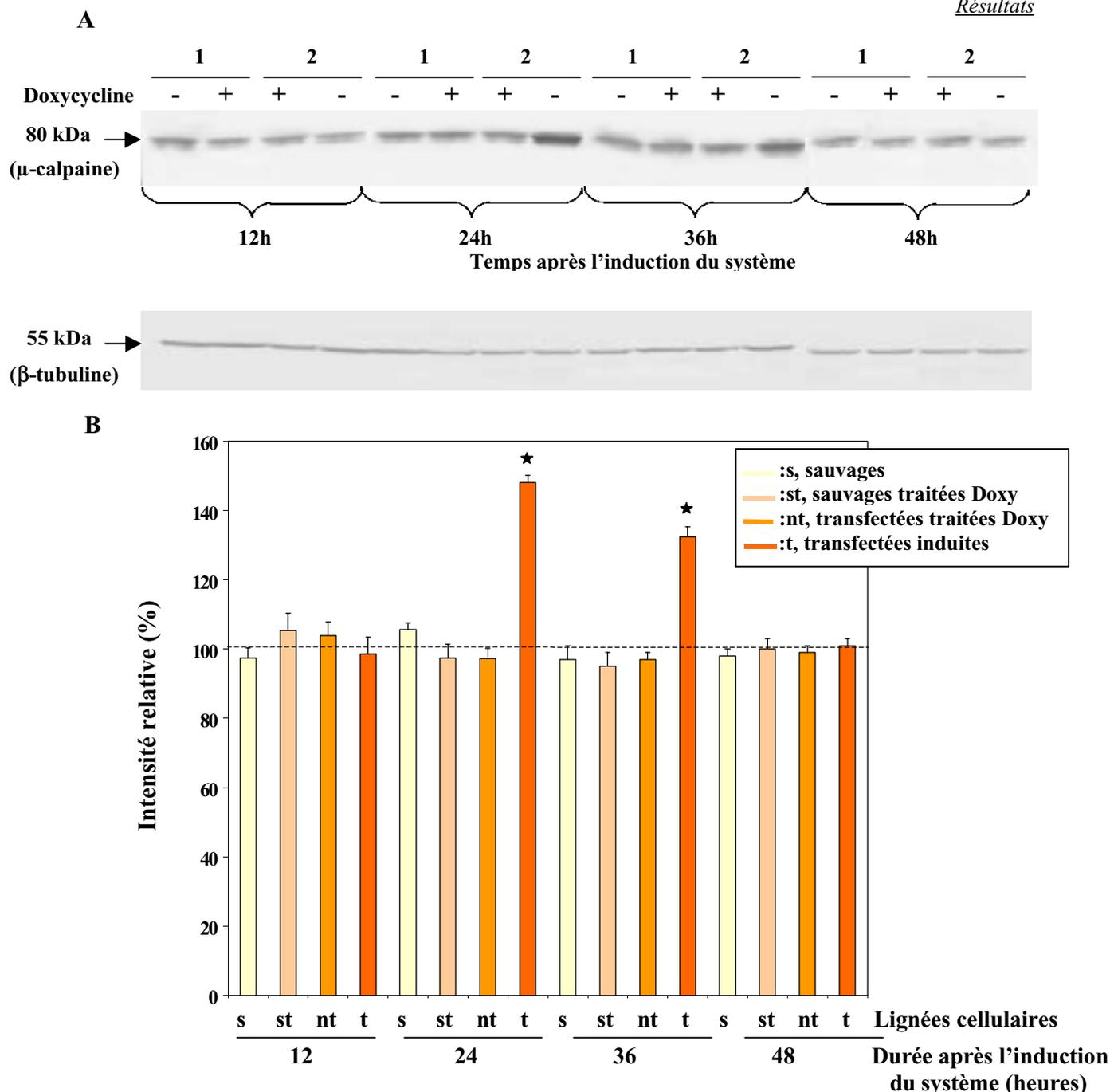


Figure 47 : *Effet du traitement à la doxycycline sur la quantité de μ-calpaine*

Des extraits cellulaires (100 μg de protéine) réalisés à différents temps après l'induction de la moitié des cellules en culture sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux anti μ-calpaine (80 kDa) (1/1000) et polyclonaux anti β-tubuline (55 kDa) (1/1000) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

A : Immunorévélation

Puits 1: C2C12 sauvages, non transfectées

Puits 2: C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice contenant l'ADNc de la μ-calpaine humaine.

B : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport au témoin correspondant (représenté par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 6).

s: C2C12 sauvages; st: C2C12 sauvages traitées à la doxycycline; nt: C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK/pTet-Splice-μ-calpaine humaine, traitées à la doxycycline; t: C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK/pTet-Splice-μ-calpaine humaine et induites après suppression de la doxycycline du milieu de culture.

★ différence significative par rapport au témoin (p < 0,05).

En conclusion, l'induction du système Tet-Regulated Expression System sensible à la doxycycline permet la synthèse d'un ARNm sens dès 12 heures après la suppression de l'antibiotique, sa traduction en protéine entraînant, 24 heures plus tard, une augmentation significative du niveau d'expression de la μ -calpaine dans les myoblastes. Nous avons donc créé une lignée cellulaire dans laquelle l'expression de la μ -calpaine est accrue de manière très significative.

II.3.3 Effet du traitement sur l'activité enzymatique de la μ -calpaine

Un dosage de l'activité protéolytique de la μ -calpaine a été établi pour vérifier que la protéine surexprimée était bien active (Figure 48). Une étape préalable de purification partielle sur chromatographie échangeuse d'anions (Mono Q HR 5/5 PHARMACIA BIOTECH) a été nécessaire pour le dosage de l'activité calcium-dépendante.

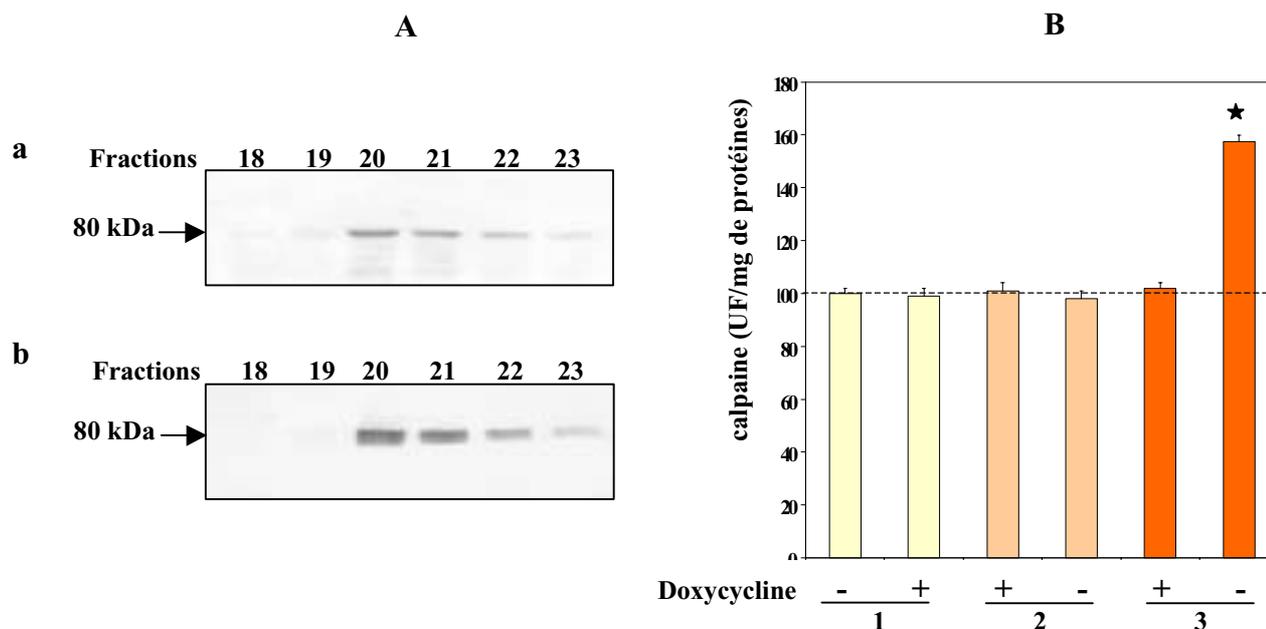


Figure 48 : **Immunorévélation des fractions éluées après chromatographie FPLC et dosage de l'activité calcium-dépendante de la μ -calpaine.**

A : Les myoblastes transfectés avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice- μ -calpaine ont été traités à la doxycycline puis le système a été induit. Les échantillons non induits (a) et induits (b) ont été préparés 24h plus tard puis passés sur colonne échangeuse d'anions. Les fractions 18 à 23 recueillies sont soumises à une SDS-PAGE et transférées sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux de la μ -calpaine (80 kDa) (1/1000).

B : Les fractions 18 à 23, obtenues après passage sur la colonne des échantillons induits ou non des C2C12 sauvages (1), C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice vide (2) ainsi que C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice- μ -calpaine (3), ont été rassemblées et leurs activités calcium-dépendantes dosées. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

★ différence significative par rapport au témoin (p < 0,05)

La figure 48 montre une augmentation significative de la protéine et de son activité calcium-dépendante dans les myoblastes transfectés avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice- μ -calpaine induits. Cette hausse est de l'ordre de 60 %. Un taux constant est retrouvé dans les cellules, induites ou non, utilisées comme témoins à savoir les C2C12 sauvages et C2C12 transfectées avec les vecteurs pTet-tTAK / pTet-Splice vide.

Les résultats de ce dosage d'activité nous permettent de conclure que la protéine qui se trouve exprimée par le système Tet possède bien une activité protéolytique propre. La lignée cellulaire ainsi créée voit son taux de μ -calpaine surexprimé ; les conséquences de ce phénomène vont pouvoir dès lors être déterminées tant au niveau moléculaire que physiologique.

3^{ème} partie

CONSEQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE LA μ -CALPAINE

Comme nous venons de le voir dans la seconde partie des résultats, le Tet-Regulated Expression System nous a permis de surexprimer la μ -calpaine, aussi bien en ARNm, qu'en protéine dans la lignée de myoblastes de souris C2C12. L'activité de la protéase qui en résulte est également supérieure aux taux normalement trouvés pour ces cellules.

Les effets de cette surexpression vont être dès lors analysés. Nous nous sommes plus particulièrement attachés à en regarder les conséquences sur la différenciation des myoblastes (fusion et morphologie), sur l'expression des autres acteurs du système protéolytique neutre calcium-dépendant ainsi que sur certaines protéines (facteurs de transcription myogéniques et du cytosquelette) que nous présageons être des substrats potentiels de la μ -calpaine.

I - EFFET DU TRAITEMENT SUR LA DIFFERENCIATION DES MYOBLASTES

Les myoblastes transfectés avec les vecteurs du système Tet et surexprimant la μ -calpaine (**C2C12- μ**) sont mis à proliférer puis à différencier dans les milieux adaptés, additionnés de doxycycline. Au quatrième jour après la mise en différenciation, les cellules sont induites ou non.

Pour chaque expérience réalisée, des lignées cellulaires témoins vont être menées dans les mêmes conditions et analysées en parallèle : C2C12 sauvages (**C2C12-s**) et C2C12 transfectées avec les pTet-pTAK et pTet-Splice-vidé (**C2C12-v**), toutes deux induites ou non après traitement à la doxycycline.

I.1 Effet sur la fusion des myoblastes

Les cellules des différentes lignées sont traitées, fixées puis colorées en vue de leurs observations microscopiques et du dénombrement des noyaux dans les myoblastes et les myotubes. D'après la courbe préalablement établie sur les C2C12 sauvages (cf. 1^{ère} partie des résultats), la fusion se situe en phase ascendante rapide au quatrième jour après la mise en différenciation.

Douze heures après l'induction du système, le pourcentage de fusion est déterminé toutes les 12 heures, sur une période de trois jours (Figure 49).

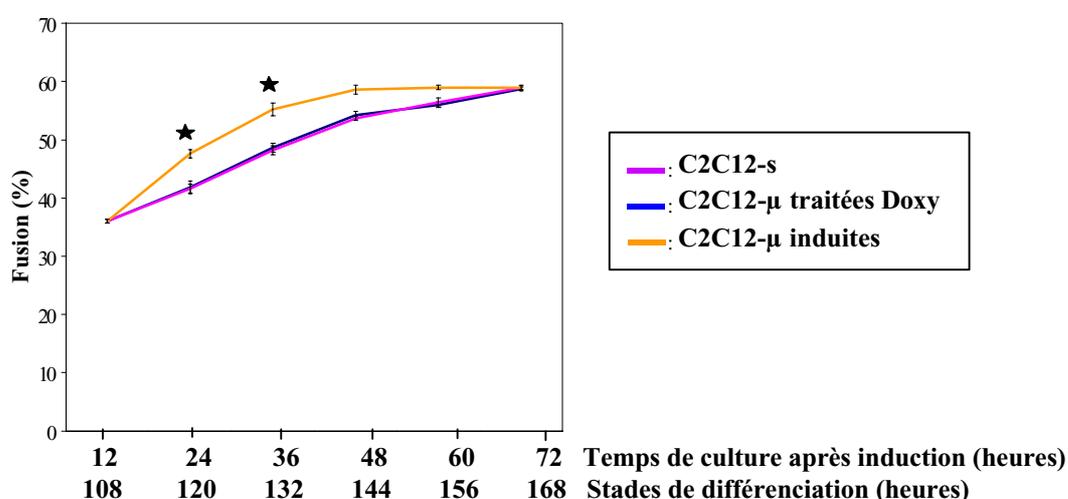


Figure 49 : *Incidence de la surexpression de la μ -calpaïne sur la fusion des myoblastes de la lignée C2C12*

Les C2C12- μ ont été traitées à la doxycycline puis le système a été induit au 4^{ème} jour de différenciation sur la moitié des cellules en culture. La fusion a été évaluée dès lors toutes les 12 heures sur 72 heures selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes. Des C2C12 sauvages ont été suivies parallèlement.

Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 6).

★ différence significative par rapport au témoin (p < 0,05)

Comme le montre la figure 49, la vitesse de fusion des cellules C2C12- μ induites, c'est-à-dire celles surexprimant la μ -calpaïne, est significativement plus rapide que celle des C2C12- μ ou la doxycycline n'a pas été retirée du milieu. Elle est 14% plus rapide entre 24 et 36 heures puis elle régresse en efficacité passant à 8,6 et 5% aux stades 48 et 60h. Le maximum de fusion (60%) est cependant retrouvé ; il n'y a donc pas d'élévation du nombre de myoblastes qui ont fusionné. La courbe de fusion des C2C12 sauvages (C2C12-s) suit celle des C2C12 non induites. Un résultat similaire est retrouvé lorsque les myoblastes sauvages sont traités

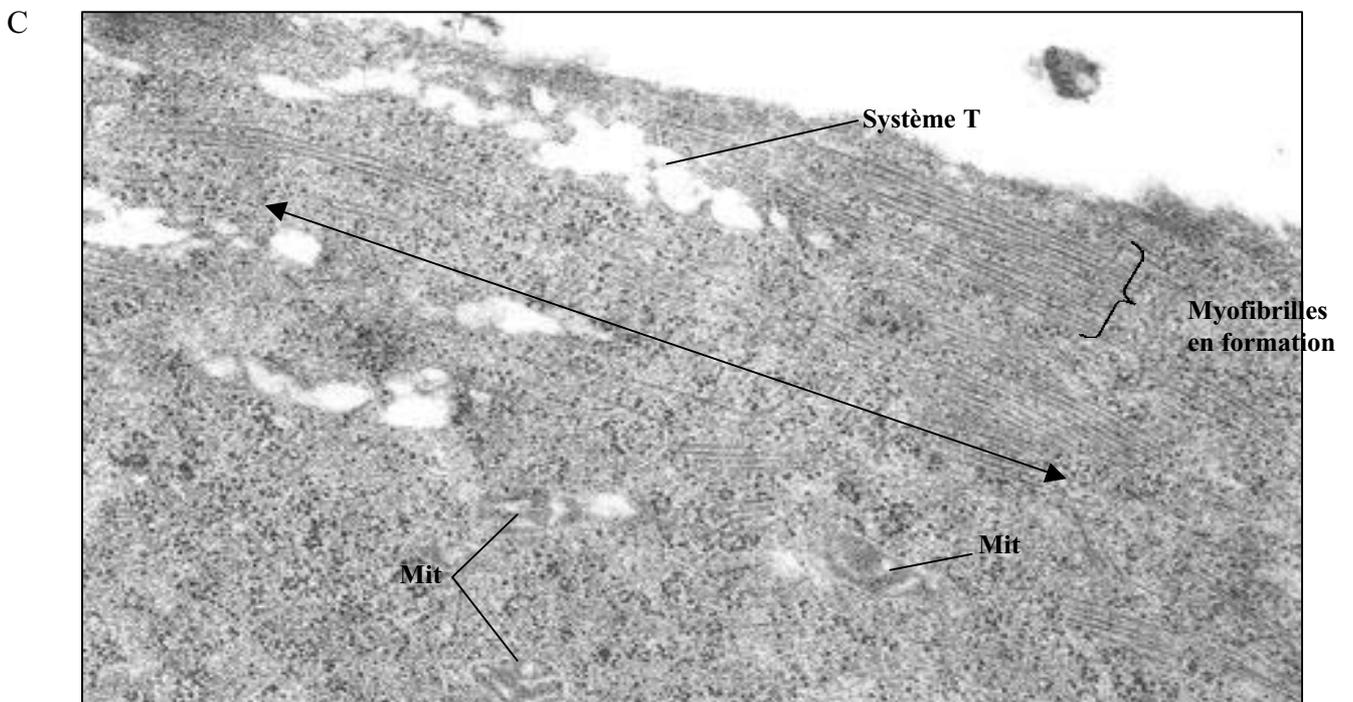
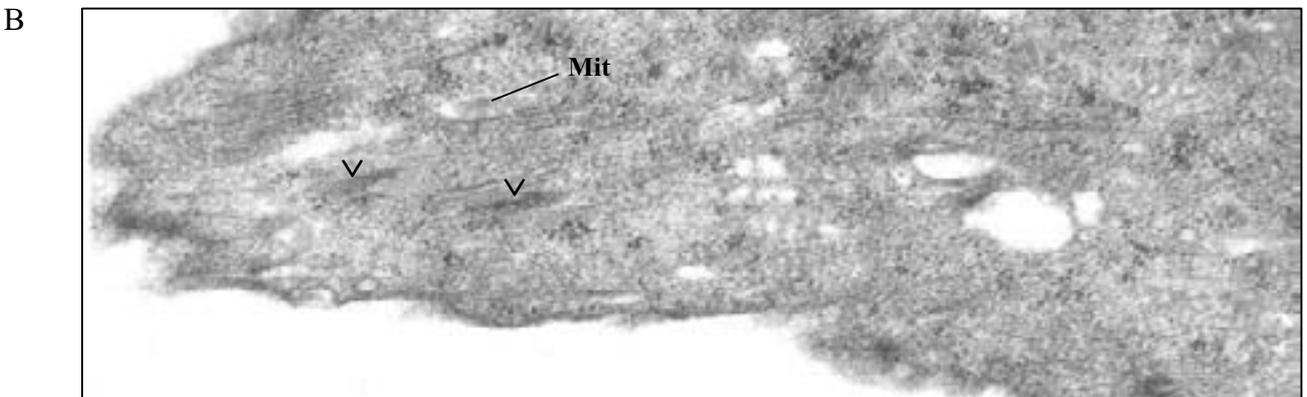
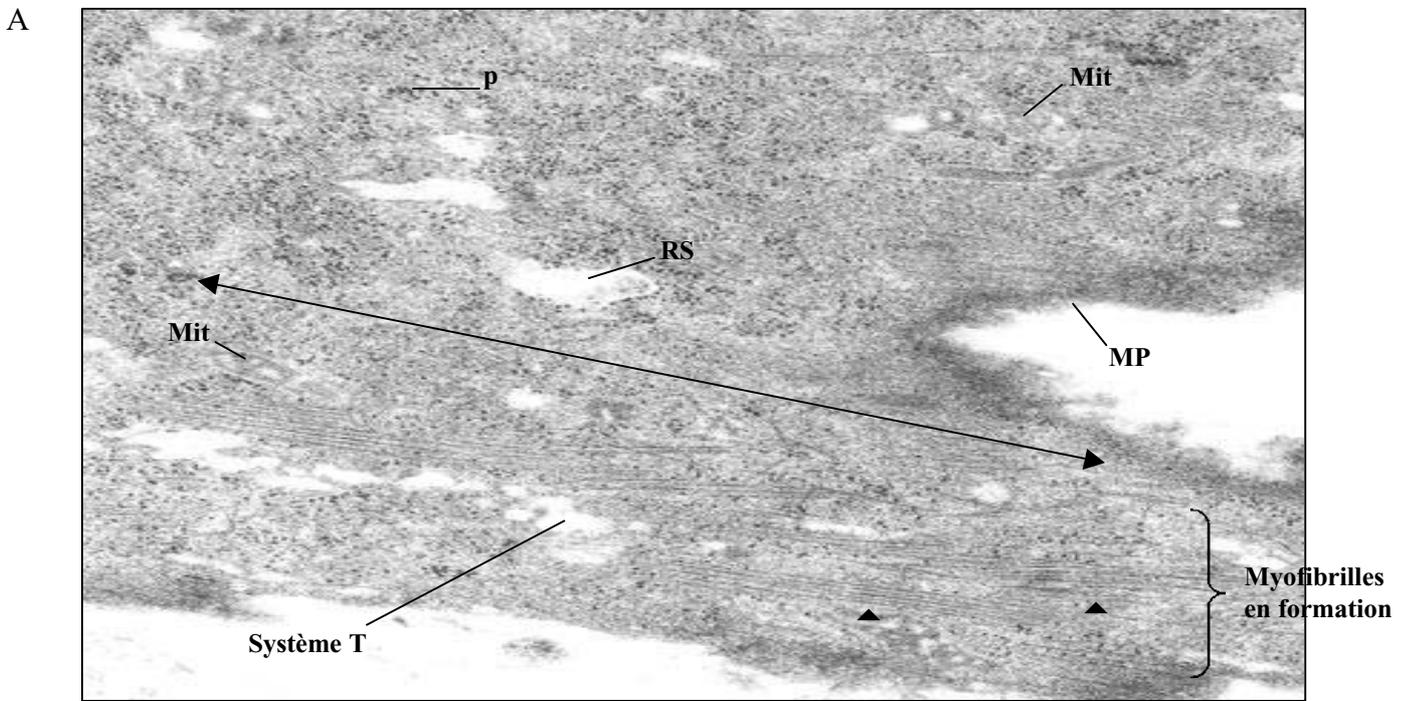


Figure 50 : *Coupes longitudinales et tangentielles de myotubes issus de la lignée C2C12, non transfectés, sauvages.*

Mit: mitochondrie; MP: membrane plasmique; p: polysomes; RS: réticulum sarcoplasmique; ▲ : bandes M; v : corps denses (précurseurs des bandes Z); ↔ : direction générale des myofibrilles (axe longitudinal des fibres musculaires). x 23250

avec l'antibiotique : l'augmentation rapportée n'est donc pas due à un effet secondaire de l'inducteur. Il en est de même pour les C2C12-v induites on non et analysées dans les mêmes conditions : la transfection des myoblastes n'a donc aucune incidence sur ce phénomène.

La surexpression de la μ -calpaine dans la lignée de myoblastes C2C12 entraîne une augmentation de la vitesse de fusion de ces cellules. Cette protéase pourrait donc être impliquée dans le processus de fusion des myoblastes.

I.2 Effet sur la morphologie cellulaire

Suite à la surexpression de la μ -calpaine dans les myoblastes/myotubes de la lignée C2C12, nous nous sommes attachés à regarder les conséquences de ce phénomène sur la morphologie des cellules et particulièrement sur leurs ultrastructures. Cette étude a été réalisée par microscopie électronique (cf. Matériels et méthodes). Les résultats exposés dans ce paragraphe ont été obtenus 48 heures après l'induction du système Tet, quatre jours après la mise en différenciation, dans les myoblastes de la lignée C2C12.

Les myoblastes sauvages de la lignée C2C12 (C2C12-s) sont ensemencés dans un milieu de prolifération additionné de 10% de sérum de veau foetal puis mis à différencier en présence de 2% de sérum de cheval. Environ trois jours après l'induction de la différenciation, les myoblastes commencent à fusionner. Ils donnent naissance à des myotubes, cellules plurinucléées, à l'intérieur desquelles des myofibrilles se forment. Par la suite, le phénomène de fusion s'amplifie.

Dans ces cellules, la myofibrillogenèse est donc amorcée (Figure 50). Dans un premier temps, elle se traduit par la formation de classiques faisceaux de filaments fins ainsi que des corps denses qui apparaissent sous la membrane plasmique. Puis, en profondeur, ces faisceaux évoluent en classiques myofibrilles striées transversalement où les bandes A et M sont bien visibles. Le système T se forme en annexant des vésicules membranaires. Les myofibrilles typiques qui sont formées sont orientées parallèlement au grand axe de la cellule et ce même alignement général est noté pour tous les autres éléments du cytosquelette.

La formation de ces myofibrilles ainsi que l'agencement du cytosquelette revêtent des aspects caractéristiques bien connus dans la littérature (Fischman (422) (423), Douglas (424), Larson (425), Robert (426), Robert (427) et Walter (428)).

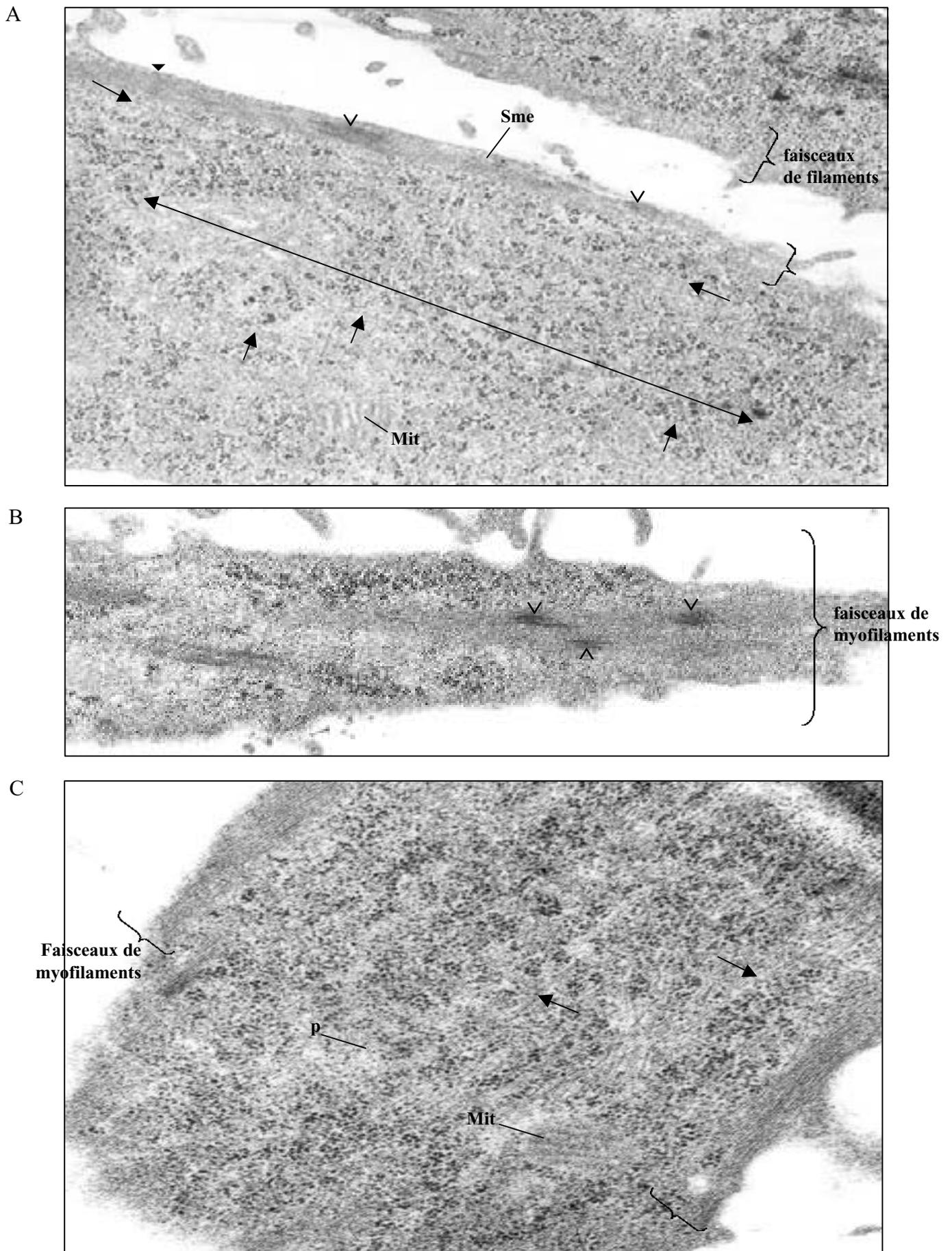


Figure 51 : *Faisceaux de filaments de la lignée C2C12 dans des coupes longitudinales et tangentielles à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET mais non induits.*

Mit: mitochondrie; p : polysomes ; Sme: sarcomere; \blacktriangle : bandes M; ∇ : corps denses (précurseurs des bandes Z); \longleftrightarrow : direction générale des myofibrilles; \longrightarrow : microtubules.
 A : x 23250 ; B : x 17250 ; C : x 31500.

En ce qui concerne la cytologie générale de la cellule, de nombreuses mitochondries, principal réservoir énergétique, sont mises en évidence ainsi qu'une forte concentration en ribosomes libres. Ces éléments sont repartis de manière homogène dans tout le sarcoplasme. Ils sont la preuve de forte production d'énergie et synthèse de protéines de la part de la cellule musculaire en formation (Figure 50).

Les myoblastes transfectés avec les vecteurs du système inductible Tet (pTet-tTAK et pTet-Splice- μ -calpaine humaine) ainsi que le plasmide de sélection pcDNA3.1/Hygro ont été mis à différencier de façon analogue aux C2C12 sauvages, les milieux de prolifération et de différenciation contenant de la doxycycline et de l'hygromycine.

Après quatre jours d'une telle culture, l'induction du système, c'est-à-dire le renouvellement du milieu de différenciation mais sans ajout de la doxycycline, est réalisée sur la moitié des cellules en culture. Les cellules non induites serviront de témoins aux cellules induites surexprimant la μ -calpaine. Il est important de noter que d'autres cellules témoins ont été observées aux mêmes temps suite à l'induction du système. Ainsi nous citerons les myoblastes sauvages traités avec les deux antibiotiques (doxycycline 0,5 μ g/ml et l'hygromycine 650 μ g/ml). En effet, de part leur mode d'action et particulièrement sur la synthèse de protéines, tous deux pourraient avoir des conséquences sur la morphologie et l'ultrastructure des cellules. De plus, les myoblastes transfectés avec les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice-*vide* (C2C12-v) ont été suivis dans les conditions citées précédemment pour le vecteur recombinant.

Les myoblastes transfectés par le système Tet recombinant (pTet-tTAK et pTet-Splice- μ -calpaine humaine) mais non induits montrent une complète similitude dans le mode de différenciation en comparaison aux C2C12 sauvages. Les myotubes formés présentent le même agencement, la même diversité et la même répartition des éléments (mitochondries, polyribosomes, faisceaux de filaments, ...) au niveau du sarcoplasme que les C2C12 sauvages. La myogenèse apparaît comme normale avec la formation de myofibrilles et un même alignement général du cytosquelette (Figure 51). Rien ne permet de distinguer les deux systèmes.

Les différentes lignées cellulaires utilisées comme témoins (myoblastes transfectés avec le vecteur dépourvu de l'insert, dont le système a été induit ou non et C2C12 sauvages traitées à la doxycycline et hygromycine) présentent les mêmes caractéristiques. L'ultrastructure et la

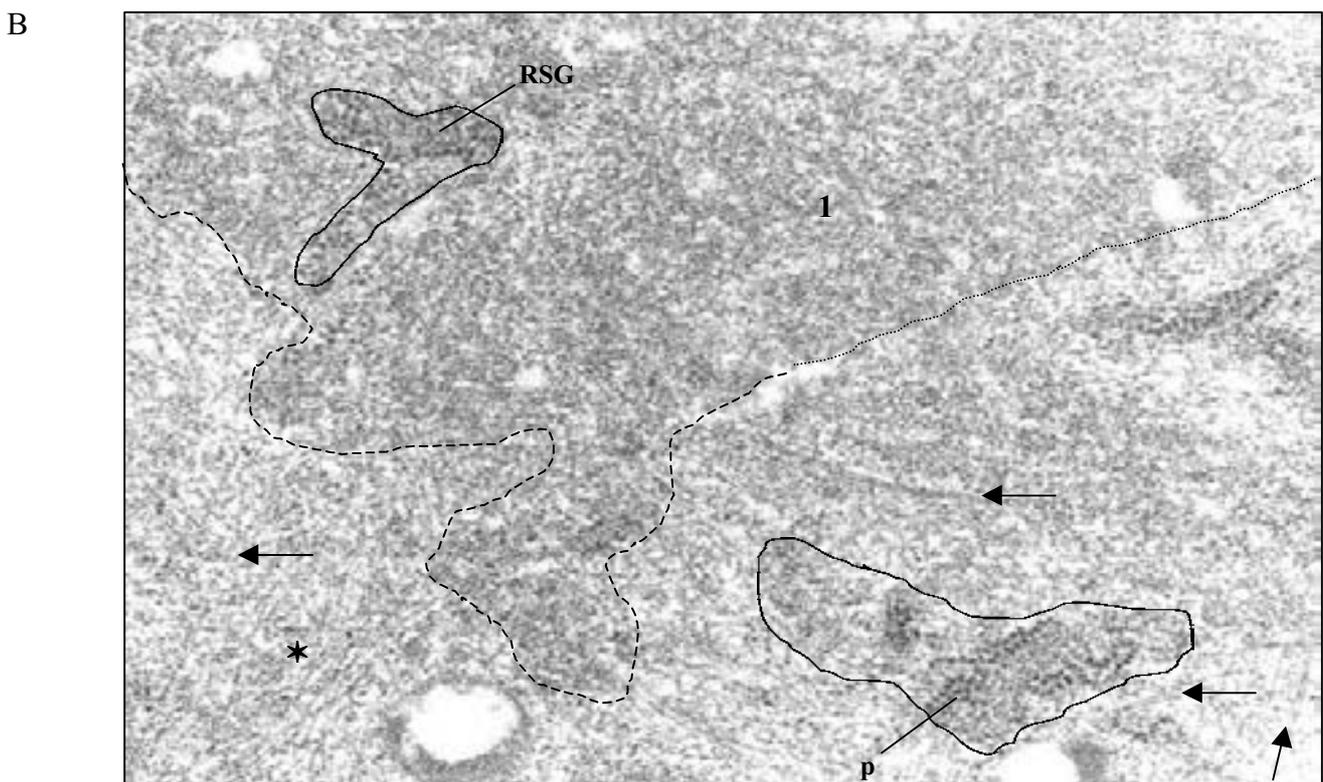
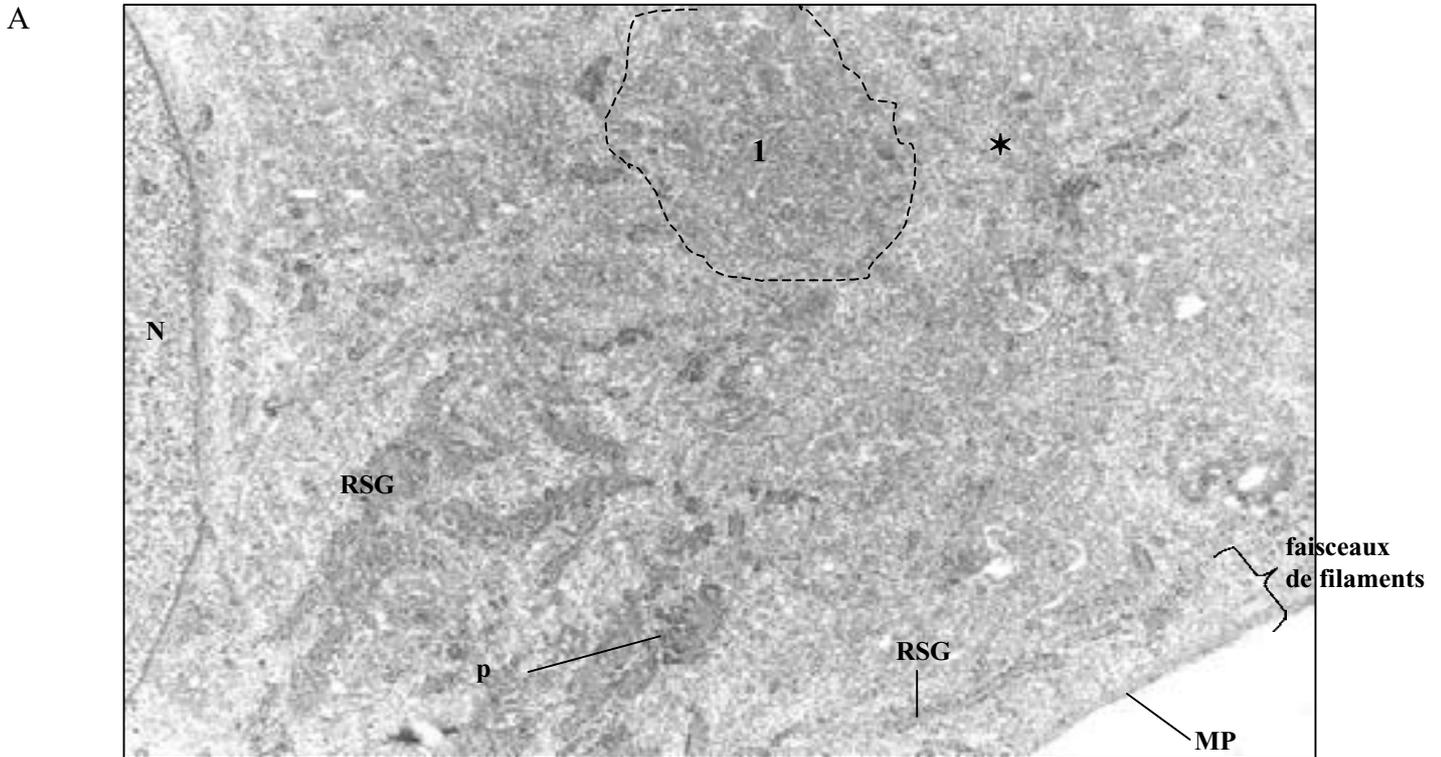


Figure 52 : *Coupes longitudinales de myotubes issus de la lignée C2C12 à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET et induits. Cytologie générale et détail à la limite entre deux types de sarcoplasme.*

Mit: mitochondrie; MP: membrane plasmique; N: noyau; p: polyribosomes; RSG: réticulum sarcoplasmique granulaire à contenu dense; * :filaments désordonnés; →: microtubules en tous sens. 1 : sarcoplasme dense.

A : x 17250, B : x 42750.

morphologie des myoblastes ne sont donc ni influencées par l'application des antibiotiques ni par la transfection du système.

En ce qui concerne les myoblastes surexprimant la μ -calpaine c'est-à-dire contenant l'insert humain et induits après le traitement à la doxycycline, il en va tout autrement.

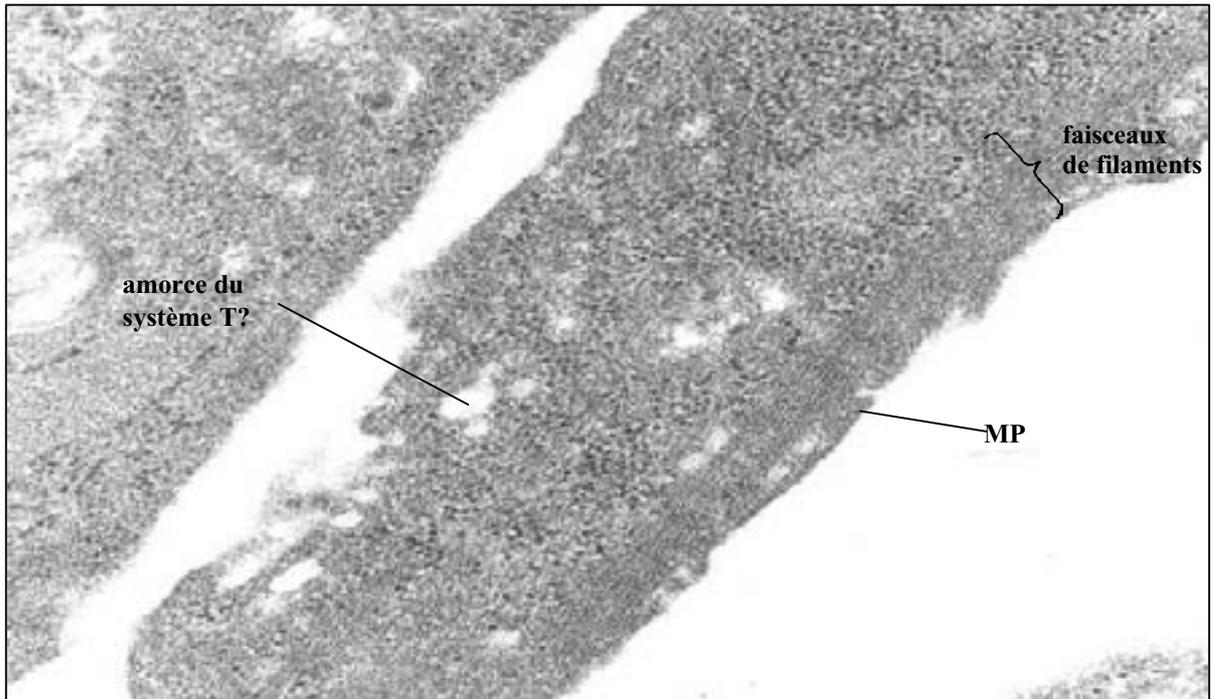
Du point de vue de la cytologie générale (Figure 52), une forte hétérogénéité du sarcoplasme est tout de suite observée. Des cordons de sarcoplasme dense se distinguent, probables amas de polysomes alors qu'ils étaient répartis dans tout le sarcoplasme dans les myoblastes sauvages ou dans les C2C12 transfectées mais dont le système de surexpression n'a pas été induit. Des vacuoles plus ou moins développées dont la nature reste à préciser sont également observées.

Le réticulum sarcoplasmique granulaire est particulièrement développé ; les polyribosomes qui lui sont associés sont très vraisemblablement à l'origine du matériel dense qui le remplit. L'importance de cet organite suggère que les polysomes synthétisent et stockent des produits qui ne peuvent être exportés. Cette observation, jointe à l'abondance d'un compartiment vacuolaire parfois très important signe un désordre profond dans le métabolisme cellulaire. Il est important de noter la raréfaction des mitochondries dans ces cellules.

La restructuration du sarcoplasme, le développement important du système de détoxification ainsi que le faible apport énergétique de la part de la chaîne respiratoire indiquent que les fibres sont profondément altérées. Cet état pourrait être le prélude à une dégénérescence de la cellule. Cette constatation est à mettre en parallèle avec la mise en évidence des premiers signes de nécrose des cellules musculaires sur certaines coupes (plage de lyse).

Pour ce qui est de la machinerie contractile, un agencement classique est observé sous la membrane plasmique à savoir des faisceaux de filaments fins, parallèles les uns aux autres avec des corps denses. Cet essai d'organisation, premiers stades de la myofibrillogenèse, permet de mettre en évidence un alignement du cytosquelette selon le grand axe des fibres (Figure 53 A). La progression vers le centre des fibres montre une désorganisation grandissante du cytosquelette qui ne présente plus d'organisation privilégiée (Figure 53 B). Ainsi, le cytosquelette est profondément déstructuré (certains filaments sont disposés perpendiculairement au grand axe de la cellule) (Figure 54 A). Des ensembles parallèles de filaments se retrouvent dans un désordre le plus complet (Figure 54 B). Cet agencement est très différent de celui observé dans les C2C12 sauvages ou dans les myoblastes transfectés chez lesquels le système de surexpression de la μ -calpaine n'a pas été induit. Dans ces

A



B

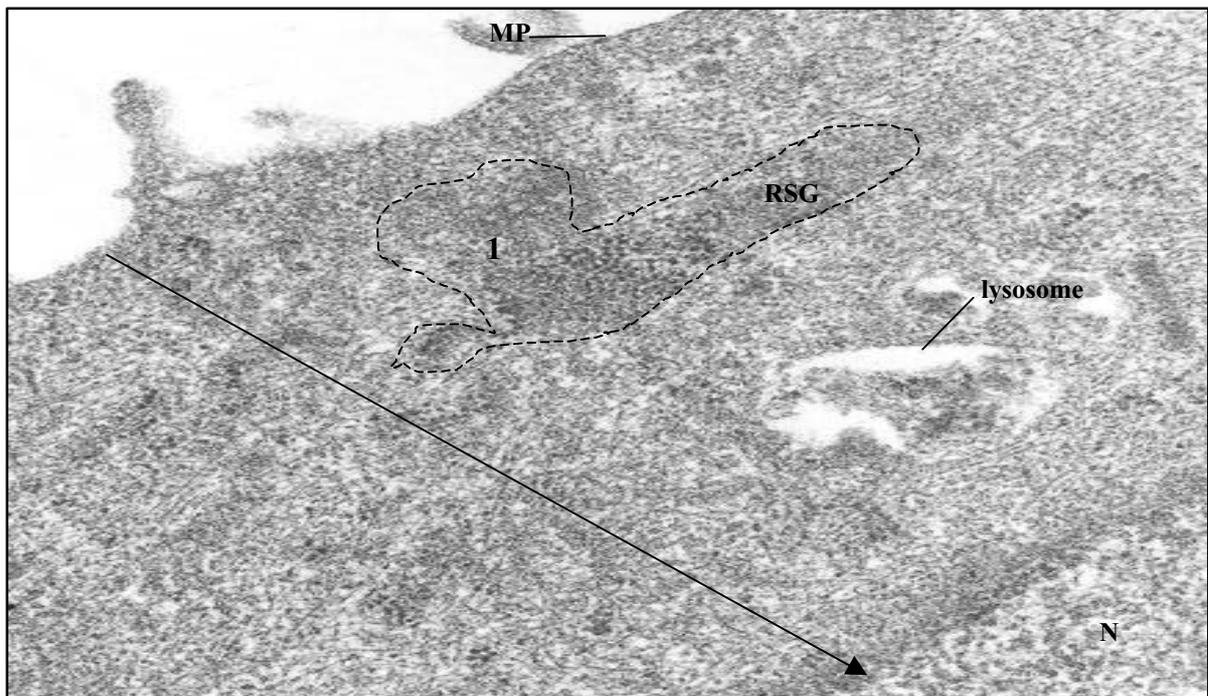
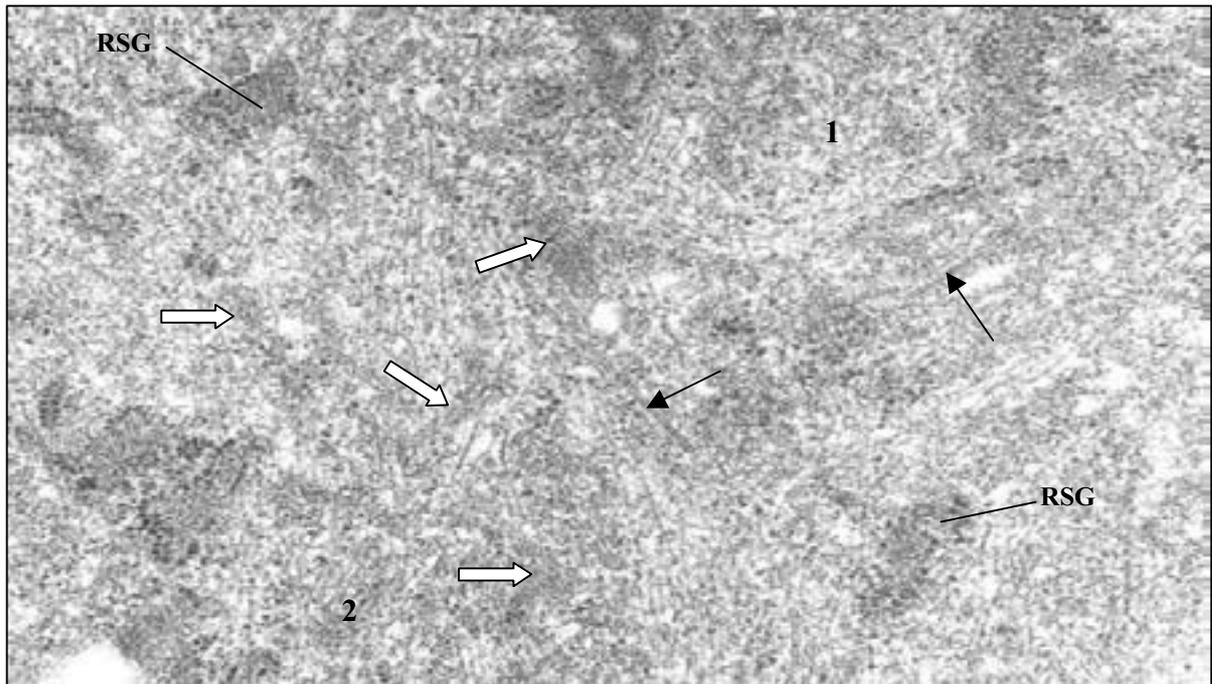


Figure 53: *Coupes longitudinales de myotubes de la lignée C2C12 à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET et induits.*

MP: membrane plasmique; N: noyau; p: polyribosomes; RSG: réticulum sarcoplasmique granulaire. 1 : sarcoplasme dense. → : passage d'un état d'alignement sous la MP à un désordre en direction centrale, vers le noyau. x 42750

A



B

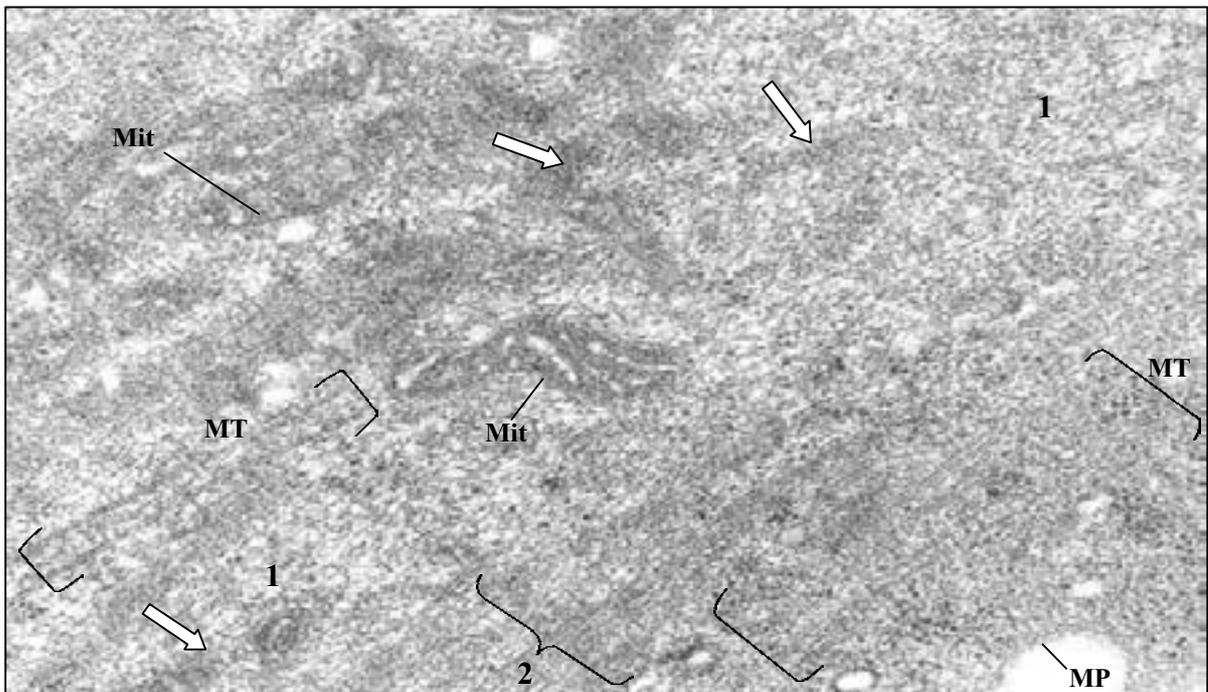


Figure 54 : *Coupes de myotubes de la lignée C2C12 à 6 jours de différenciation, transfectés par le système pTET et induits.*

Mit : mitochondrie; MP: membrane plasmique; MT : microtubules parallèles ; RSG : réticulum sarcoplasmique granulaire; 1 : filaments non alignés ; 2 : ensemble de filaments alignés (proche de la membrane plasmique) ; \rightarrow : microtubules ; \Rightarrow : cordons de sarcoplasme dense.
x 42750

cellules, la machinerie contractile montre une organisation ordonnée classique. Les myoblastes transfectés et induits commencent à fabriquer des myofibrilles mais orientées en tous sens. Ainsi, les tous premiers stades d'élaboration de cet édifice sont normaux mais très vite s'instaure un désordre qui va en s'accroissant.

En conclusion nous pouvons dire que le fait de surexprimer la μ -calpaine dans les myoblastes de souris C2C12 a des conséquences tant au niveau de l'organisation myofibrillaire de la cellule qu'au niveau de son métabolisme en général.

Une tentative d'organisation du cytosquelette est observée sous la membrane plasmique, agencement qui laisse place à un profond désordre des microtubules et microfilaments en direction centrale, vers le noyau. D'autre part, une sorte de compartimentation au niveau du sarcoplasme est notée ainsi qu'un développement important du réticulum sarcoplasmique granulaire et une raréfaction du système mitochondrial, preuve de la profonde altération des fibres musculaires.

Il serait maintenant intéressant de voir comment la μ -calpaine entraîne l'instabilité myofibrillaire que nous avons observée. Cette enzyme possède une activité protéolytique importante sur de nombreux substrats in vitro. L'utilisation d'anticorps spécifiques de ces protéines directement sur les coupes cellulaires pourrait être envisagée pour mettre en évidence le(les) protagoniste(s) concerné(s), une dégradation particulière ou un changement de localisation subcellulaire.

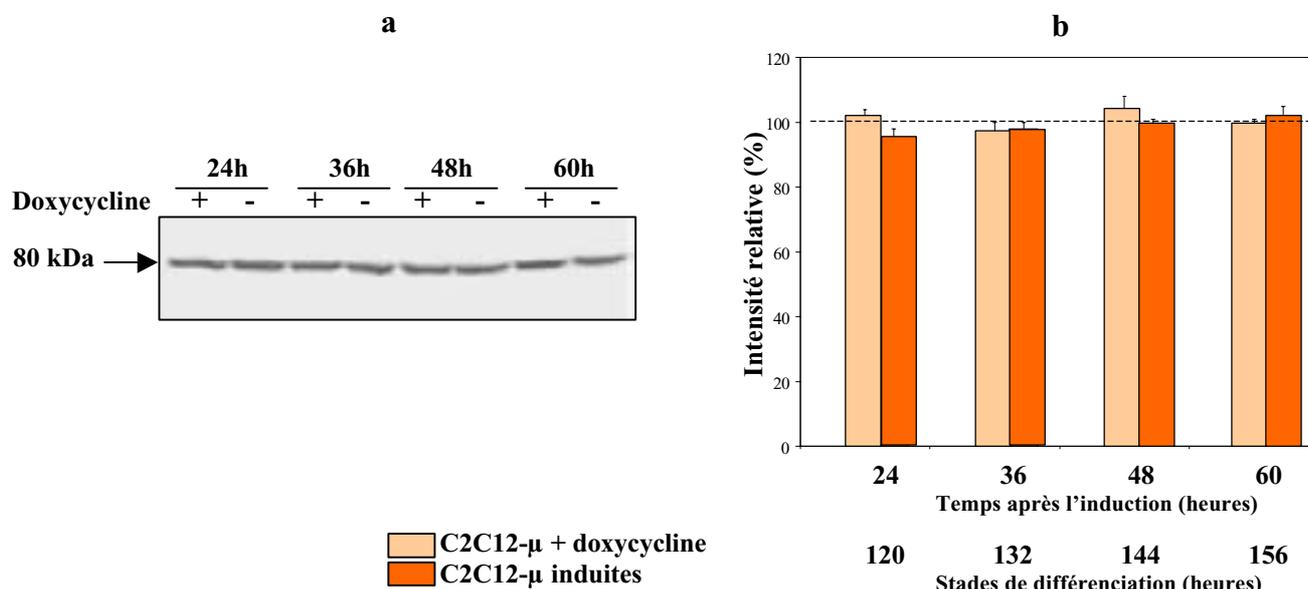
II - EFFET DU TRAITEMENT SUR LES AUTRES ACTEURS DU SYSTEME PROTEOLYTIQUE CALCIUM-DEPENDANT

Rappelons que le système protéolytique neutre calcium-dépendant est constitué de deux enzymes ubiquitaires, les μ - et m-calpaines, de leur inhibiteur spécifique, la calpastatine et d'une enzyme exclusivement retrouvée dans le muscle, la p94. La dérégulation d'une des enzymes, ici la μ -calpaine, pourrait avoir des conséquences sur l'expression des autres protéases, leurs taux étant régulés de façon à maintenir une certaine homéostasie dans la cellule.

Comme précédemment, les C2C12- μ ont été mises à différencier sous traitement à la doxycycline puis au quatrième jour de différenciation, les cellules ont été induites ou non. Les extraits cellulaires ont été préparés 24, 36, 48 et 60 heures plus tard et les variations

quantitatives suivies par immunorévélation (Figures 55 et 56). Les mêmes lignées, C2C12-s et C2C12-v, sont utilisées comme témoins de nos expériences.

A



B

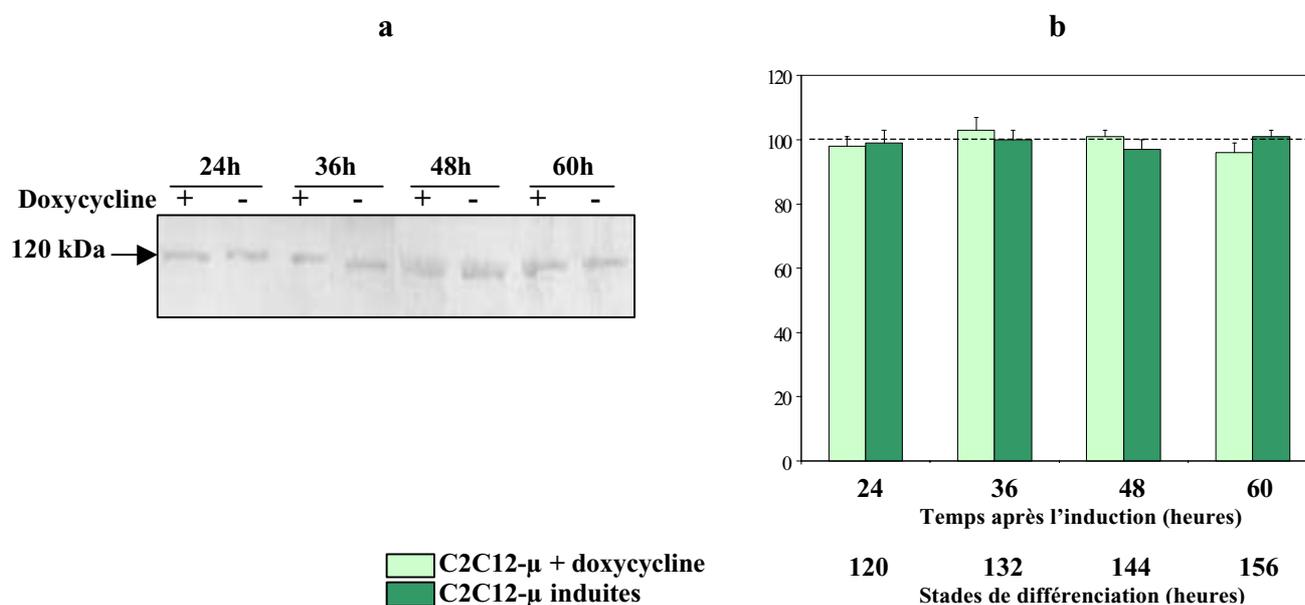


Figure 55: *Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de m-calpaine (A) et de calpastatine (B)*

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la m-calpaine (1/500) et la calpastatine (1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélations

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

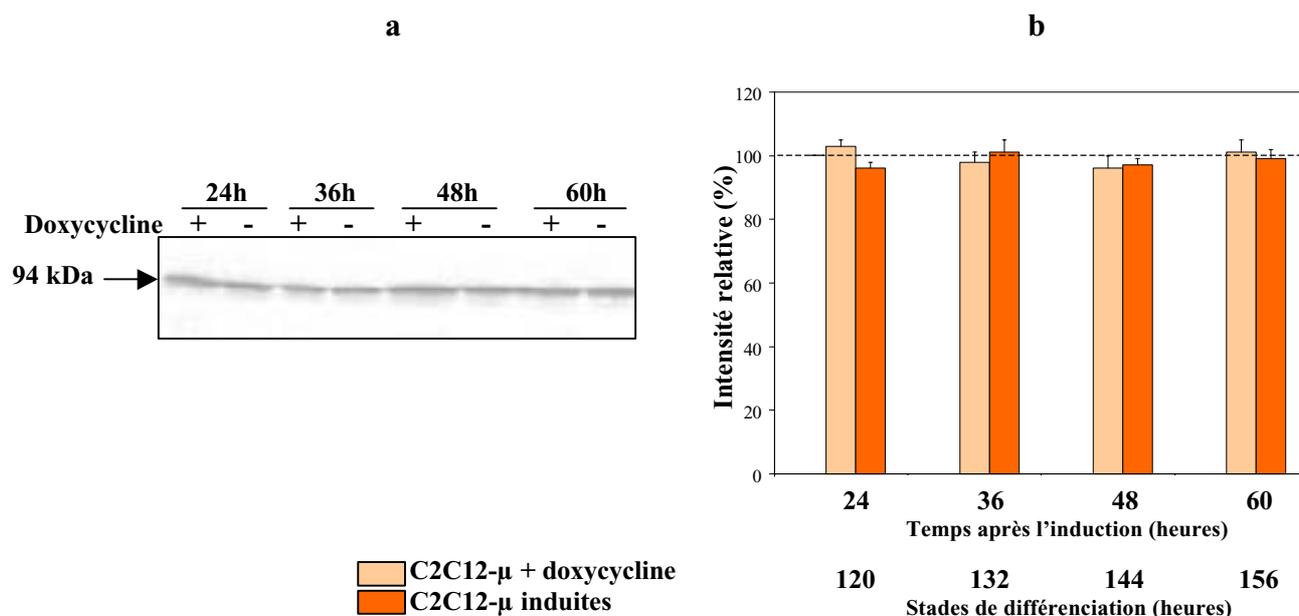


Figure 56: *Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de p94*

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la p94 (1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

Les résultats présentés figures 55 et 56 indiquent qu'aucune variation quantitative n'est mise en évidence suite à l'induction du système Tet. En d'autres termes, l'expression de la m-calpaine, de l'inhibiteur spécifique des calpaines ubiquitaires, la calpastatine et de la p94 ne semble pas être influencée par la variation de μ -calpaine. Notons que lors de la purification par FPLC de la μ -calpaine après sa surexpression dans le système Tet (cf. 2^{ème} partie des résultats), le pic correspondant à la m-calpaine (saut à 0,5 M en NaCl) n'avait subi aucune variation quantitative.

Les C2C12 sauvages traitées ou non à la doxycycline présentent les mêmes profils d'expression que ceux trouvés pour les C2C12-v après induction.

La surexpression de la μ -calpaine dans les myoblastes n'entraîne pas de variation significative des taux de m-calpaine, calpastatine ou p94.

Aucune compensation dans le niveau d'expression des deux protéases ubiquitaires, l'une par rapport à l'autre n'est notée. La calpastatine, qui possède normalement un rôle régulateur des activités protéolytiques, n'est pas modulée.

III - EFFET DU TRAITEMENT SUR L'EXPRESSION DE SUBSTRATS POTENTIELS DE LA μ -CALPAINE

III.1 Facteurs de transcription myogéniques

Les calpaines ubiquitaires sont connues pour avoir une activité protéolytique sur certains facteurs de transcription (Pariat et *al.* (429), Walowitz et *al.* (430)). Dans le muscle squelettique, il nous a paru intéressant de considérer comme substrats potentiels de l'enzyme les facteurs de transcription spécifiques de ce tissu à savoir essentiellement les facteurs de régulation myogéniques MRFs. En outre les calpaines possèdent des séquences *E-box* de type CANNTG susceptibles de fixer ces facteurs.

Nous avons donc étudié les effets de la surexpression de la μ -calpaine sur l'expression de MyoD, Myf-5 et de la myogénine.

Les cellules ont été traitées dans cette expérience de la même façon que dans les expérimentations précédentes. Après quatre jours de différenciation sous doxycycline, la moitié des cellules est induite. Les extraits cellulaires sont préparés 24, 36, 48 et 60 heures plus tard.

Les cellules témoins (C2C12-s et C2C12-v induites ou non) sont menées dans les mêmes conditions. L'intensité des signaux obtenus pour les myoblastes C2C12- μ non induites a été, dans chaque cas, rapportée à celle obtenue pour les cellules C2C12-v au même stade de culture.

Les résultats présentés figure 57 montrent que la quantité de myogénine diminue de façon significative (59%) 48h après l'induction du système, lorsque la doxycycline est retirée du milieu de culture. Cette diminution commence à s'amorcer au stade 36h (12%) puis son niveau revient progressivement à un taux basal 60h après l'initiation du traitement.

Les C2C12 sauvages ont été également testées pour déceler un éventuel effet du traitement à la doxycycline sur le niveau d'expression des facteurs myogéniques. Aucune interférence

suite au traitement n'est notée dans le taux d'expression des protéines. Ceci est également le cas en ce qui concerne la transfection en elle-même.

Pour ce qui est des facteurs de transcription MyoD et Myf-5, aucune variation quantitative de leur niveau d'expression n'a été mise en évidence suite à l'induction du système Tet (Figure 58). Les mêmes remarques que précédemment peuvent être faites en ce qui concerne les témoins cellulaires C2C12-s et C2C12-v.

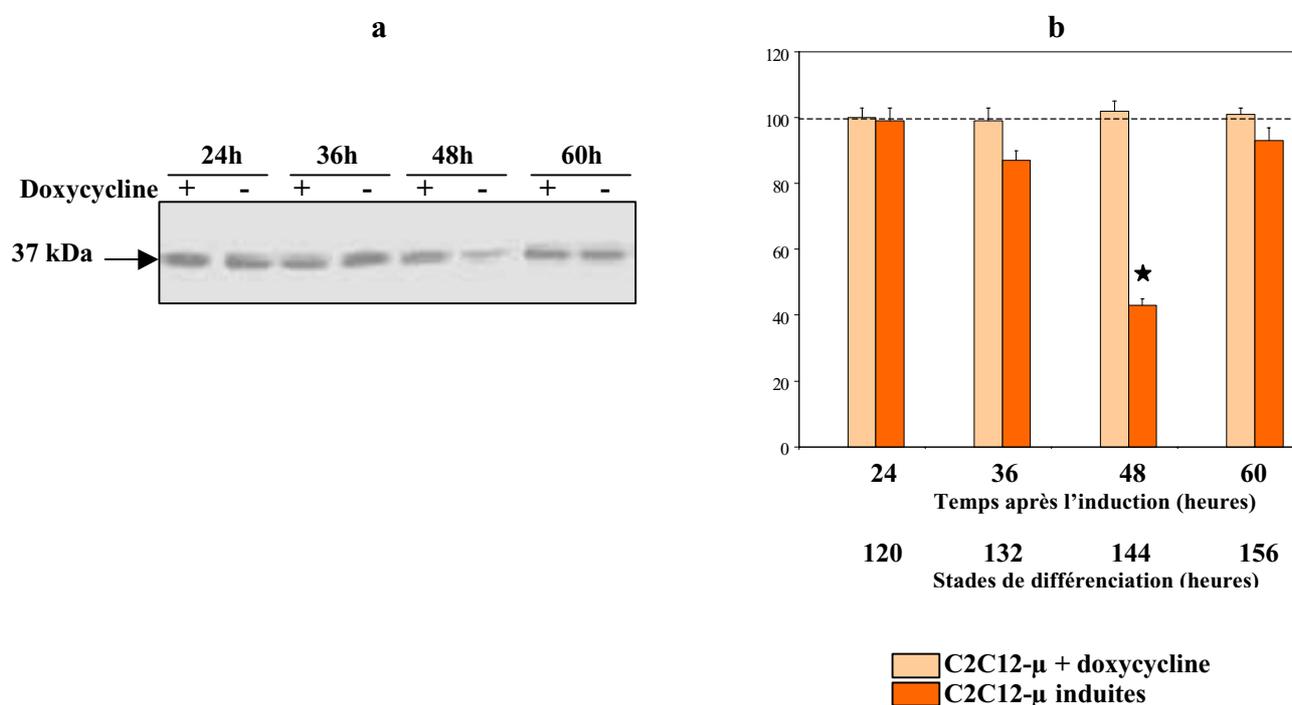


Figure 57: *Effet de la surexpression de la μ-calpain sur la quantité de myogénine*

Des extraits cellulaires (100 μg de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la myogénine (1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3). ★ Différence significative par rapport au témoin (C2C12-v) (p < 0,05)

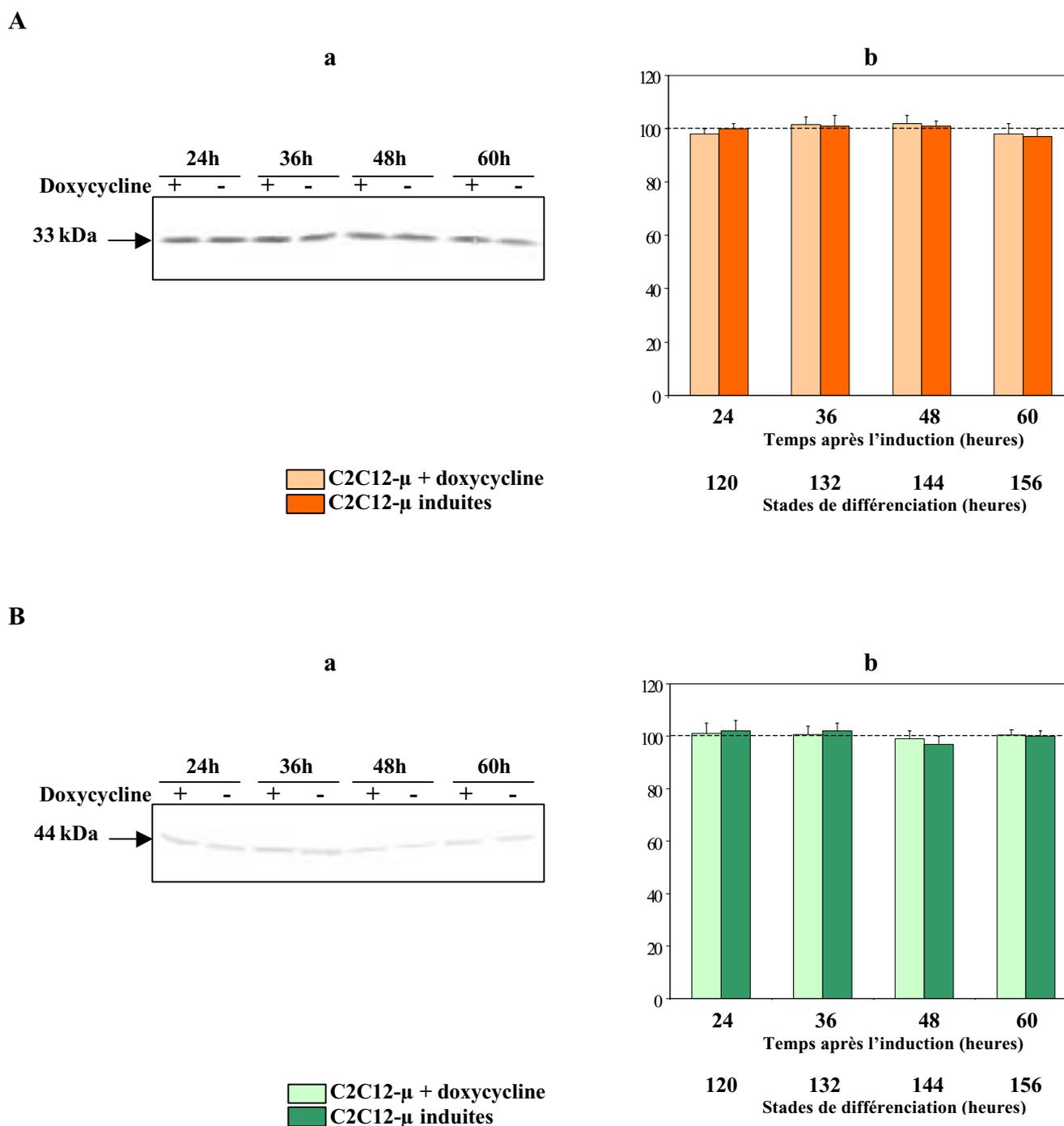


Figure 58: *Effet de la surexpression de la μ-calpaine sur la quantité de MyoD (A) et de Myf-5 (B)*

Des extraits cellulaires (100 μg de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre MyoD (1/1000) et Myf-5 (1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

La surexpression induite de la μ -calpaine entraînerait une diminution significative de la quantité d'un des facteurs de transcription spécifiques du muscle, la myogénine. Dans nos conditions expérimentales, MyoD et Myf-5 ne se révèlent pas être des substrats de la protéase.

Selon ces résultats, il semblerait qu'un lien existe entre la μ -calpaine et l'un des facteurs de transcription myogéniques. Cependant les travaux réalisés au cours de ce travail ne permettent pas de déterminer par quelle voie la protéase agit sur la myogénine ni même si cette action se fait de façon directe ou indirecte.

Quelques hypothèses peuvent être formulées en ce qui concerne la relation qu'il existe entre ces deux protéines. La surexpression de la μ -calpaine entraîne 12-24 heures plus tard une diminution de la quantité de myogénine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la μ -calpaine régulerait le niveau d'expression de la myogénine dans les cellules musculaires, à l'état basal. Ainsi, suite à l'induction du système, la protéine serait dégradée de façon plus importante. La myogénine serait alors un substrat de la μ -calpaine.

Il est d'autre part possible de considérer que la μ -calpaine agit de façon indirecte sur le facteur de transcription. Le mode d'action des facteurs impliqués dans la régulation de la myogénèse reste encore à l'heure actuelle peu connu. De nombreuses interactions moléculaires du type protéine/protéine ou protéine/ADN feraient intervenir des produits des gènes MRFs et MEF2 (Weintraub (431), Molkenin et al. (432)) de façon directe ou par l'intermédiaire de régulateurs et co-facteurs dont la plupart restent encore à découvrir (Yun et Wold (433)). Etant donné la complexité de ces mécanismes de régulation, il y a de fortes chances pour que les variations quantitatives de la myogénine que nous avons obtenues et la surexpression de la μ -calpaine ne soient pas directement liées. L'hypothèse la plus probable quant à l'action de la protéase sur ce facteur myogénique serait qu'elle dégrade un régulateur positif de l'expression de cet MRF.

III.2 Protéines du cytosquelette et contractiles

Les calpaines ubiquitaires, μ - et m-calpaines, ont une activité protéolytique sur de nombreuses protéines ; cette action se ferait plus dans un but de régulation du rôle du substrat que de son catabolisme. L'un des objectifs de notre étude était d'essayer de discriminer le rôle

de ces deux protéases au cours du phénomène de différenciation de la cellule musculaire, leur expression semblant être alternée dans le temps dans certains types cellulaires (Cottin et al. (434), Poussard et al. (435)). Il est donc notamment intéressant de connaître l'action de la μ -calpaine sur les protéines cytosquelettiques et associées, sachant par ailleurs que le phénomène de fusion implique un réarrangement important du cytosquelette et qu'une désorganisation de la structure myofibrillaire a été mise en évidence dans les pathologies musculaires dues à une augmentation de l'expression de la μ -calpaine.

Comme nous l'avons déjà mentionné, de nombreuses protéines du cytosquelette et protéines contractiles sont connues pour être d'excellents substrats *in vitro* de la μ -calpaine. Dans notre système, il va être possible de voir le comportement *ex vivo* de la protéase vis-à-vis de ceux-ci.

Les myoblastes de la lignée C2C12- μ ont été induits après quatre jours de différenciation et les extraits cellulaires réalisés 24, 36, 48 et 60 heures plus tard. Comme dans le cas des facteurs de transcription myogéniques, les cellules de la lignée C2C12-v ont été utilisées comme référence pour tous les stades observés.

Les figures 59 et 60 présentent les protéines dont l'expression a subi des variations suite à l'induction du système Tet.

D'après la quantification des signaux obtenus après immunorévélation, la quantité de la protéine **ezrine** diminue de façon significative (68%) 48 heures après le début de l'induction. A 60 heures, une amorce de retour au niveau basal est observée (83%).

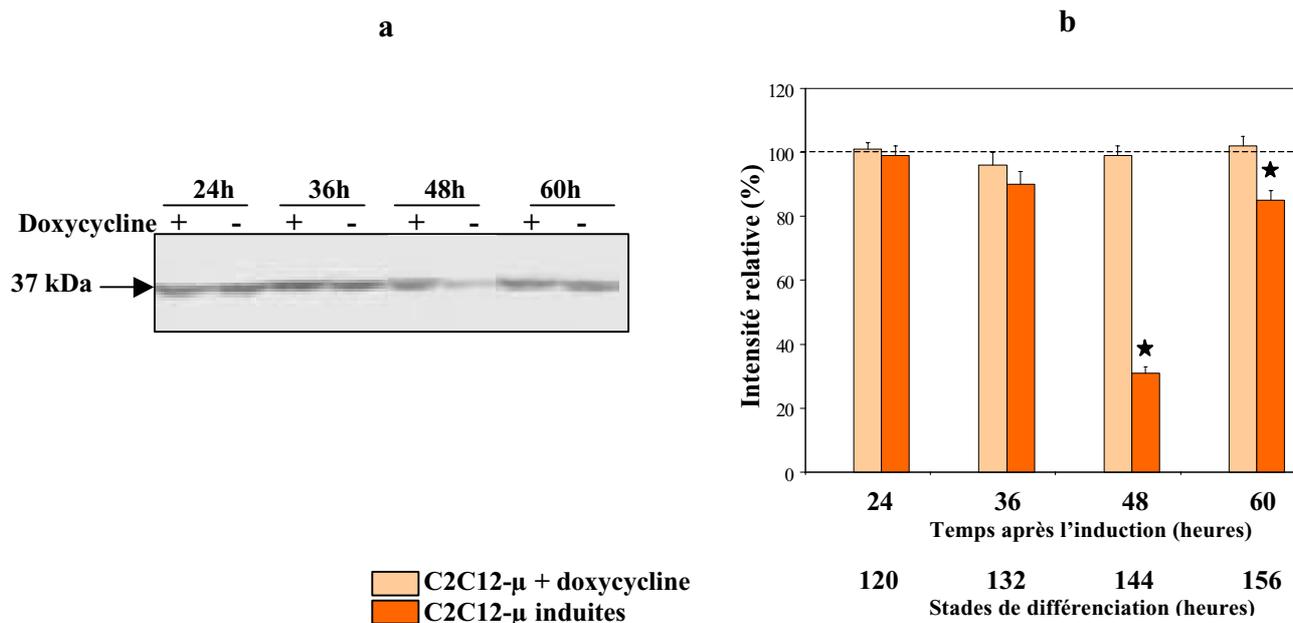
Pour ce qui est de la **vimentine**, elle est à 36% de son taux normal c'est-à-dire qu'elle subit une diminution significative de 64% à 48h.

La **cavéoline 3** présente également une modification significative d'expression suite à la surexpression de la μ -calpaine. A 48 heures, elle n'est plus qu'à 24% de son niveau basal (76% de diminution) et à 36 et 60 heures elle atteint 83 et 79% de son taux initial. Remarquons qu'un signal a été obtenu 24 heures après l'induction du système c'est-à-dire au cinquième jour de différenciation ; la cavéoline 3 apparaît donc dans le muscle entre le quatrième (cf. 1^{ère} partie des résultats) et le cinquième jour.

Les fragments de dégradation de ces trois protéines n'ont pas pu être visualisés sur les immunorévélations obtenues.

Les cellules témoins C2C12 sauvages traitées à la doxycycline ont permis de constater que le traitement n'avait aucun effet sur le taux normal de ces protéines.

A



B

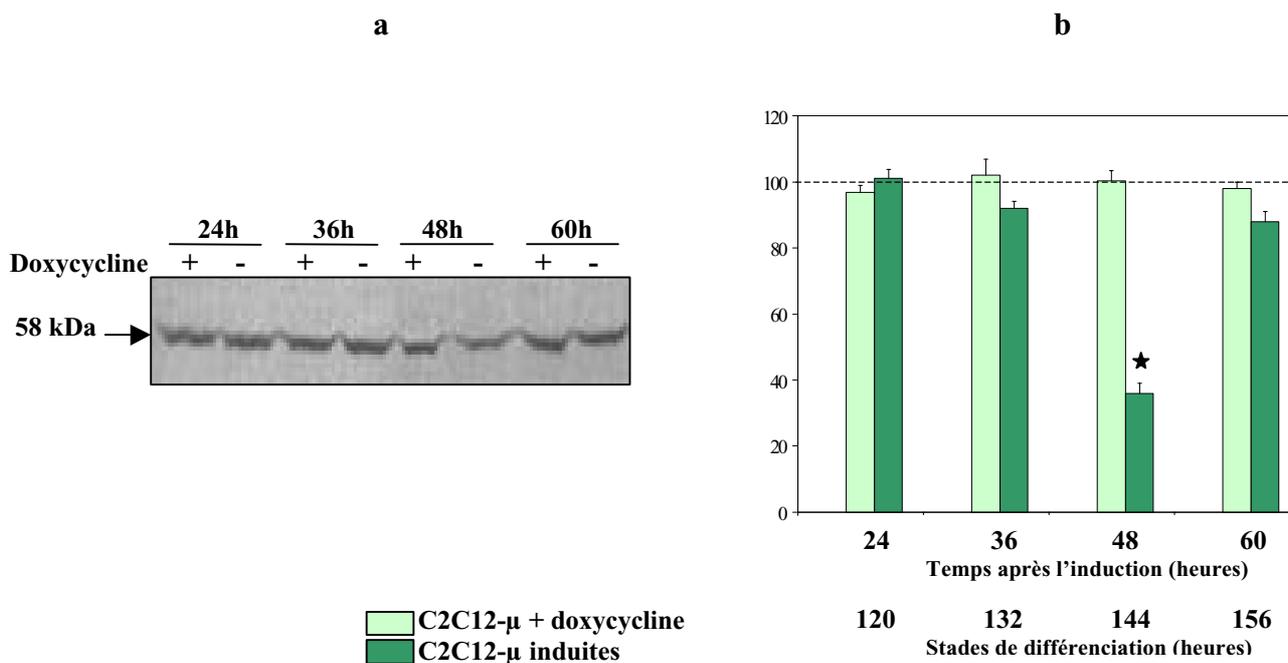


Figure 59 : *Effet de la surexpression de la μ-calpain sur la quantité d'ezrine (A) et de vimentine (B)*

Des extraits cellulaires (100 μg de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorevelation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre l'ezrine (1/500) et la vimentine (1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorevelations

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne ± l'erreur standard à la moyenne (n = 3). ★ Différence significative par rapport au témoin (C2C12-v) (p < 0,05)

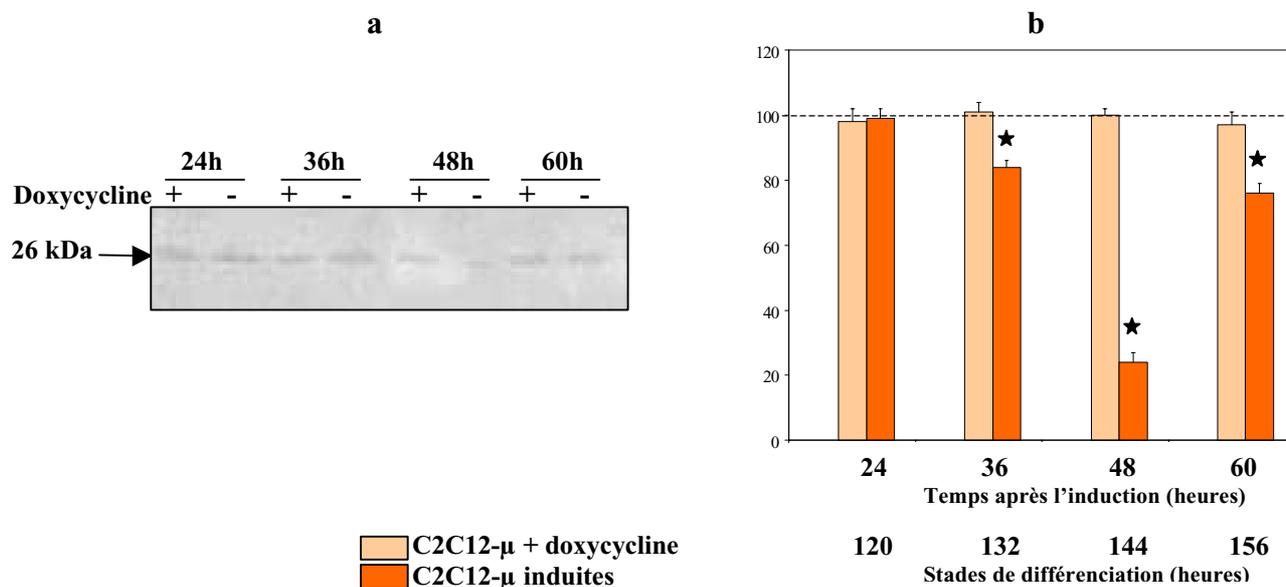


Figure 60 : *Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de cavéoline 3.*

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre la cavéoline 3 (1/500) et monoclonaux dirigés contre la fibronectine (1/1000) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3). ★ Différence significative par rapport au témoin (C2C12-v) (p < 0,05)

D'autres protéines substrats *in vitro* de la μ -calpaine ont été testées dans les mêmes conditions ; ces protéines ne subissent pas de modification de leur expression suite à la surexpression de la μ -calpaine dans les myoblastes de la lignée C2C12. Il s'agit de l'actine, de l'annexine, de la desmine, de la dystrophine, de la fibronectine, de la spectrine et de la taline. Les figures 61 et 62 montrent les immunorévélations obtenues pour la desmine, la taline et la fibronectine.

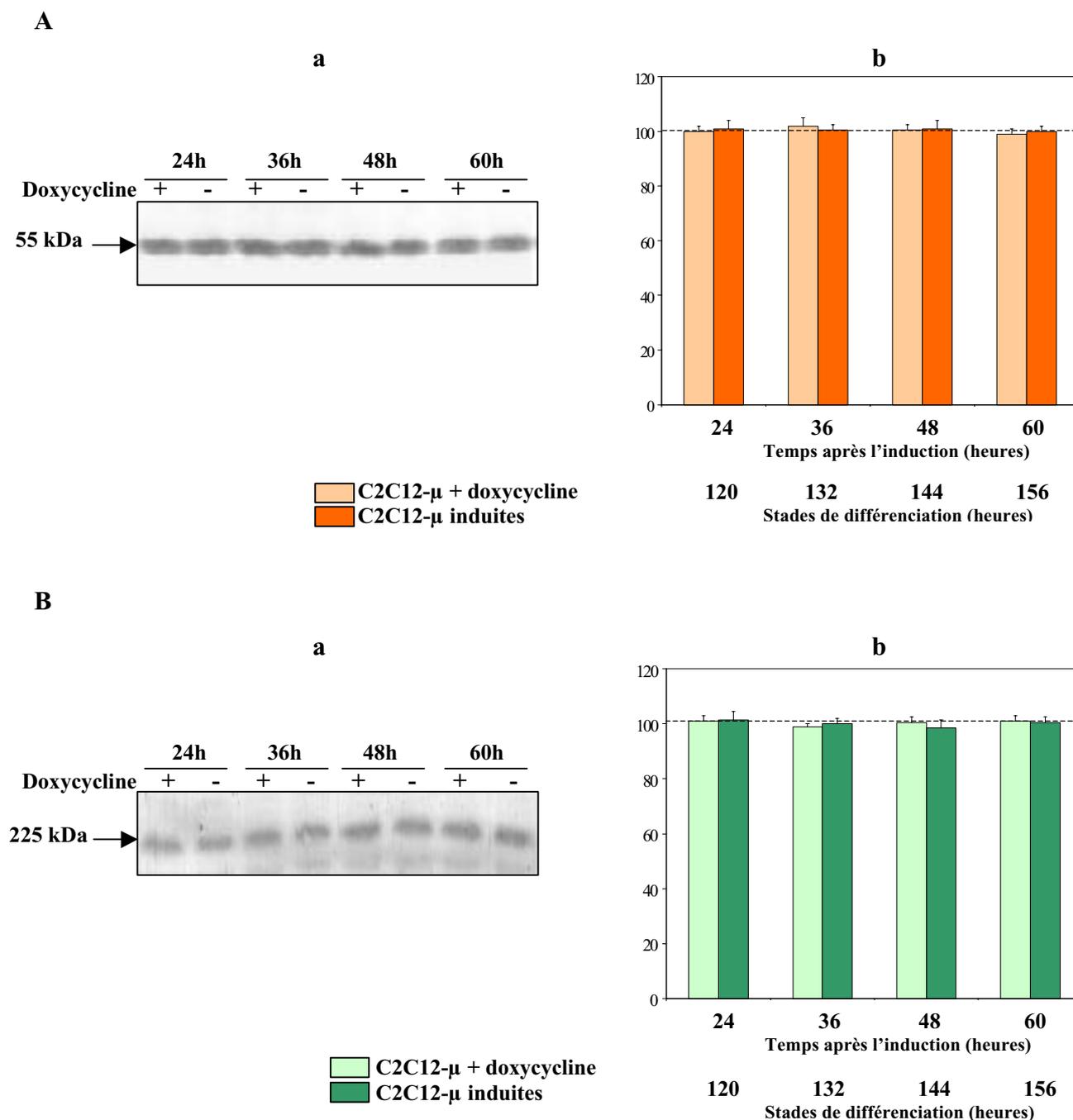


Figure 61: *Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de desmine (A) et de taline (B)*

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la desmine (1/1000) et polyclonaux dirigés contre la taline (1/500) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

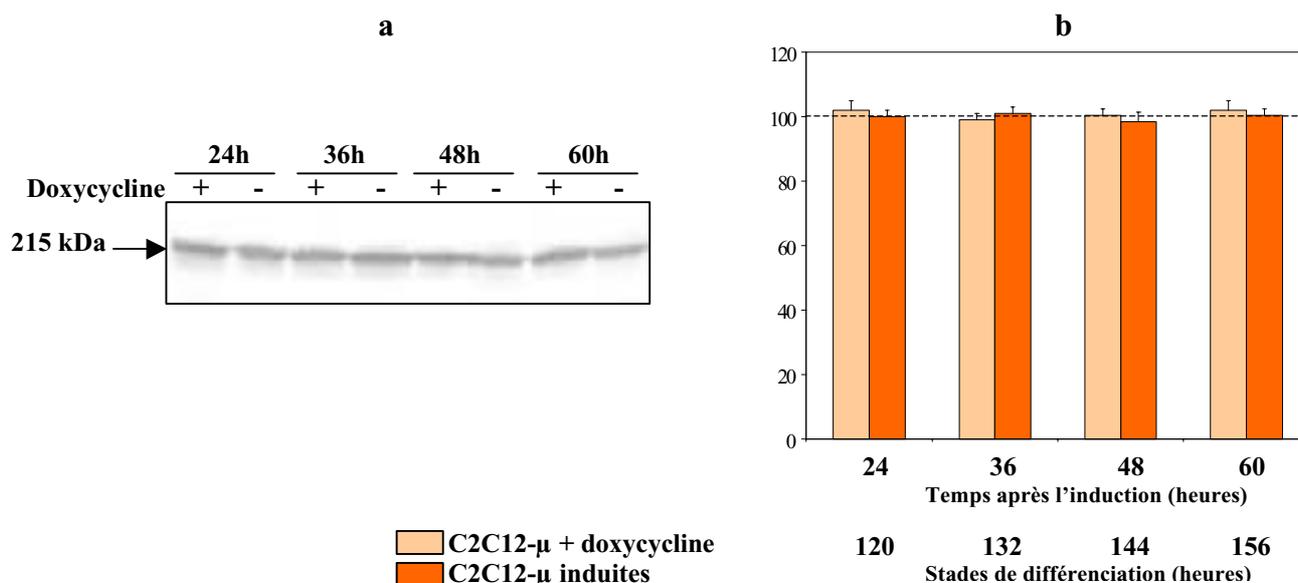


Figure 62: *Effet de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de fibronectine*

Des extraits cellulaires (100 μ g de protéine) réalisés à différents temps après l'induction du système Tet sont soumis à une SDS-PAGE et transférés sur membrane d'Immobilon. L'immunorévélation est réalisée en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la fibronectine (1/1000) selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et méthodes.

a : Immunorévélation

b : Quantification par vidéo-densitométrie

L'intensité des signaux est exprimée en pourcentage par rapport à celle obtenue pour les cellules de la lignée C2C12-v (représentée par la ligne en pointillés). Les valeurs correspondent à la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (n = 3).

Il apparaît donc que, dans les cellules ayant un taux de μ -calpaine augmenté, les quantités d'ezrine, de vimentine et de cavéoline 3 sont diminuées. Ces protéines sont donc des substrats ex vivo de la μ -calpaine.

Dans nos conditions expérimentales, l'actine, l'annexine, la desmine, la dystrophine, la fibronectine, la spectrine et la taline ne voient pas leurs expressions varier suite à l'induction de notre système. Il est probable que de nombreux substrats potentiels de la μ -calpaine identifiés in vitro ne constituent pas tous des cibles privilégiées de l'enzyme in vivo ; ils pourraient varier en fonction de l'état de la cellule ou du type cellulaire étudié. Lors du phénomène de différenciation, les microfilaments et filaments intermédiaires pourraient présenter une organisation telle que les sites de clivage présents sur ces protéines seraient momentanément inaccessibles pour la μ -calpaine.

L'eitrine et les protéines ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) apparentées permettent l'ancrage de l'actine du cortex cellulaire à la membrane plasmique. Elles agissent de façon pléiotropique à l'interface membrane-cytosquelette, sous le contrôle des voies de transduction régulées par les GTPases de la famille Rho. La dénaturation sélective de l'eitrine dans les cellules a confirmé le rôle essentiel de cette molécule pour la biogenèse et le maintien de la forme cellulaire.

La vimentine, elle, est un constituant essentiel des filaments intermédiaires ; elle sert à l'ancrage et au maintien en place des divers organites cellulaires ainsi que de la forme et de la structure de la cellule. Akkila et al. (436) ont affirmé que cette protéine est un élément essentiel dans la réorganisation du cytosquelette lors du développement musculaire. Une dégradation de ces deux protéines suite à la surexpression de μ -calpaine pourrait expliquer les observations faites en microscopie électronique où un profond désordre au niveau du cytosquelette et une ségrégation des éléments dans le sarcoplasme ont été observés.

Nous avons choisi d'étudier le comportement de la cavéoline 3 plutôt que celui de la cavéoline 1 car cette première est spécifique du tissu musculaire dans lequel elle est associée à la dystrophine (Song et al. (437)). Cette protéine se situe dans des structures appelées caveolae et aurait un rôle décisif dans certaines régulations comme la « down-regulation » des PKC α (Oka et al. (438)) ou la fusion, différenciation des myoblastes (Galbiati et al. (439)). Plusieurs études (Engelman et al. (440)) ont montré son implication dans diverses pathologies dont les dystrophies musculaires et particulièrement la limb-girdle muscular dystrophy (Minetti et al. (441), McNally et al. (442) et Galbiati et al. (443)) où son expression est effondrée.

Comme pour les facteurs de transcription myogéniques, la μ -calpaine est susceptible d'agir directement ou de façon indirecte sur ces trois protéines. Ainsi, elle pourrait dégrader certains substrats qui eux-mêmes interviennent dans d'autres boucles de régulation. Cela pourrait être notamment le cas de la cavéoline 3 qui possède une activité inhibitrice sur la PKC α (Prevostel et al. (444)) et la PKA. Ces kinases, à leur tour, participent à la phosphorylation de nombreuses protéines.

DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

L'étude du rôle biologique du système neutre calcium-dépendant au cours de la différenciation musculaire constitue un enjeu majeur pour la connaissance de la physiologie du tissu musculaire. Plusieurs travaux déjà réalisés au laboratoire font état de la forte implication de ce système lors du processus de fusion des myoblastes. Ainsi, Balcerzack et *al.* (445) (446) ont montré que la m-calpaine participait à ce phénomène et que l'inhibiteur endogène de ces protéases (la calpastatine) permettait de réguler son action dans les cellules myogéniques. D'autre part, une apparition séquentielle des ARNm, protéines et activités des μ - et m-calpaines a été mise en évidence en culture primaire de myoblastes de rat (Poussard et *al.* (447), Cottin et *al.* (448)). Ainsi, la m-calpaine serait présente lors de stades précoces de la différenciation musculaire alors que la μ -calpaine participerait à des stades plus tardifs. Cette présence alternée d'expression et d'activité des deux protéases, ainsi que les différences dans leurs distributions subcellulaires (Schollmeyer (449), Kumamoto et *al.* (450), Moraczewski et *al.* (451)) nous a laissé penser que ces enzymes pouvaient avoir des rôles distincts, spécifiques au cours de la myogenèse et par extrapolation dans les pathologies musculaires où elles se trouvent dérégulées (Hussain et *al.* (452), Tidball et Spencer (453)).

La discrimination du rôle de chacun de ces deux protagonistes et particulièrement de l'implication de la μ -calpaine lors du processus de différenciation myoblastique nous a intéressés lors de ce travail.

Au cours de cette étude, nous avons donc entrepris de reproduire en culture *ex vivo* les circonstances pathologiques observées dans le cadre de certaines dystrophies musculaires. En d'autres termes, nous avons créé une lignée musculaire dans laquelle l'expression de la μ -calpaine pouvait être significativement augmentée suite à l'induction d'un système d'expression eucaryote. En effet, une augmentation de l'expression de la μ -calpaine a été mise en évidence dans les dystrophies musculaires de Duchenne et Becher (Ueyama et *al.* (454)).

Le travail rapporté dans ce manuscrit comporte différentes parties. En premier lieu, la lignée cellulaire dont nous nous sommes servis a été caractérisée : la fusion quantifiée, l'évolution du niveau d'expression des différents acteurs du système protéolytique neutre calcium-

dépendant et de certaines protéines musculaires déterminée (Dargelos et *al.* (455)) au cours de la différenciation des cellules C2C12. Par la suite, nous nous sommes attachés à montrer l'efficacité des vecteurs inductibles que nous avons transfectés dans notre modèle cellulaire afin de surexprimer la μ -calpaine. Enfin, les conséquences de l'induction du système d'expression ont été analysées au niveau de la fusion et de la morphologie des myoblastes ainsi que sur certaines protéines musculaires (facteurs de transcription myogéniques, protéines du cytosquelette et associées).

CULTURE SECONDAIRE DE MYOBLASTES DE SOURIS : CARACTERISATION DU MODELE EXPERIMENTAL
MISE EN PLACE ET EVALUATION DU NIVEAU D'EXPRESSION DES ACTEURS DU SYSTEME NEUTRE CALCIUM-DEPENDANT ET DE CERTAINS DE LEURS SUBSTRATS POTENTIELS

La **fusion** des myoblastes de la lignée C2C12 a été quantifiée par la réalisation de la courbe de fusion. Les résultats obtenus indiquent que, dans nos conditions expérimentales, les myoblastes commencent à fusionner 2 jours après l'initiation de la différenciation et que le processus continue jusqu'au huitième jour. A ce stade, la vitesse de fusion ralentit. A 12 jours, environ 60% des noyaux sont dénombrés dans les myotubes, le phénomène n'évoluant plus par la suite.

Les différentes études rapportées en ce qui concerne la fusion de cette lignée cellulaire présentent une certaine variabilité d'un laboratoire à l'autre ; cette diversité pourrait certainement s'expliquer par des conditions de culture quelque peu différentes (Lawson et Purslow (456)). Ainsi, Temm-Grove et *al.* (457) ont montré que les premiers myotubes sont visibles dès 24 h après l'initiation de la différenciation, leurs nombres et leurs tailles augmentant ensuite jusqu'à environ 70 h, stade de différenciation pour lequel le pourcentage de fusion se situe aux alentours de 55%. Les expériences menées par Cho et *al.* (458) font état d'un processus de fusion nettement plus lent, la fusion ne devenant quantifiable que 2 jours après la diminution en sérum et atteignant environ 45% au bout de 8 jours.

D'autres types de cellules myogéniques ont été caractérisés de la même façon. La fusion des myoblastes des lignées cellulaires de rat L6 et L8 débute respectivement 2 et 3 jours après l'initiation de la différenciation ; le taux maximum de fusion est de 60 à 80% et est atteint au bout de 10 jours pour les L6 et 5 à 7 jours dans le cas des L8 (Barnoy et *al.* (459), Ebisui et *al.* (460)).

La détermination de la courbe de fusion caractéristique des myoblastes en cultures primaires de rat montre que les premiers myotubes apparaissent 20 h après la mise en culture. Soixante heures plus tard, le processus commence à se stabiliser pour atteindre un pourcentage de fusion d'environ 60% (Balcerzack et *al.* (461)). La vitesse de fusion est donc nettement plus importante dans le cas de cellules issues d'embryons de rat que dans le cas de myoblastes de lignées cellulaires. Par conséquent, bien que très utilisées comme modèle d'étude, les lignées cellulaires ne constituent pas toujours un bon reflet de la réalité physiologique.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évolution quantitative des différents acteurs du système protéolytique neutre calcium-dépendant. En ce qui concerne les **calpaines ubiquitaires** elles ne subissent aucune variation significative de leurs niveaux d'expression durant tout le processus de différenciation, résultats corroborés par ceux de Barnoy et *al.* (462) et Ueda et *al.* (463) dans la lignée L8.

Les travaux menés au laboratoire dans des cultures primaires de myoblastes de rat indiquent que la m-calpaine est présente dès le stade de prolifération et que son niveau d'expression augmente de façon corrélée à la différenciation. La μ -calpaine apparaît plus tard, lorsque les myotubes sont majoritairement représentés (Cottin et *al.* (464)). Dans des cultures primaires de cellules satellites de rat, Stockholm et *al.* (465) ont observé une augmentation des ARNm codant pour la μ -calpaine au cours de la différenciation, alors que les transcrits spécifiques de la m-calpaine subissent une légère augmentation seulement en fin de processus.

Selon Joffroy et *al.* (466), la quantité de m-calpaine au moment de la fusion des myoblastes serait directement reliée à la vitesse du processus. Lorsque la transition myoblastes/myotubes est lente (comme dans le cas des C2C12), la quantité de m-calpaine ne varierait pas significativement ; par contre, quand le processus est précoce et rapide (comme dans les cultures primaires de rat), le taux de m-calpaine augmenterait de façon corrélée à la myogenèse.

Les résultats obtenus concernant la **calpastatine** montrent que la quantité d'inhibiteur augmente de façon importante au moment où la vitesse de fusion commence à diminuer. Une évolution comparable a été mise en évidence dans les cultures primaires de myoblastes de rat (Balcerzack et *al.* (467)), dans les lignées L8 (Barnoy et *al.* (468)) et C2C12 (Temme-Grove et *al.* (469)). De plus, dans les myoblastes de rat, la quantité d'inhibiteur diminue à un moment correspondant à l'initiation de la fusion. L'ensemble de ces données indique que la régulation de la calpastatine permettrait d'une part, une augmentation de l'activité protéolytique neutre

calcium-dépendante pendant les stades précoces de la différenciation et d'autre part, une inhibition de cette activité aux stades plus tardifs du processus. Par conséquent, ces résultats, combinés à ceux obtenus dans le cas de la m-calpaine confirment l'importance de la "balance" entre la quantité de calpastatine et de m-calpaine au moment de la fusion des myoblastes.

Enfin, le niveau d'expression de la **p94** a été déterminé. Alors que la quantité d'ARNm spécifique de l'enzyme augmente au cours de la différenciation des cellules C2C12, son taux protéique ne subit aucune variation significative. Ce résultat pourrait s'expliquer par une régulation post-transcriptionnelle de l'expression de la protéase.

Dans des cultures primaires de rat, les ARNm de la p94 augmentent au cours de la différenciation (Poussard et *al.* (470)), alors que dans des cellules satellites de rat le taux des transcrits semble diminuer en fin de processus (Stockholm et *al.* (471)).

Une hypothèse de travail que nous avons émise serait que la μ -calpaine pourrait avoir, au niveau du muscle, un effet sur les facteurs de transcription myogéniques. Avant d'étudier les relations possibles existant entre la μ -calpaine et ces facteurs spécifiques du muscle squelettique, l'évolution quantitative de ces derniers a été déterminée.

Alors que le niveau d'expression de MyoD ne semble pas varier au cours de la différenciation des cellules C2C12, la quantité de Myf-5 et de la myogénine est régulée en fonction du stade observé. Le niveau d'expression de Myf-5 augmente jusqu'au stade 4 jours, où il est maximal, puis diminue au stade 6 jours pour atteindre un taux qui restera constant jusqu'à la fin du processus. En ce qui concerne la myogénine, son niveau dans les cellules C2C12 augmente jusqu'à 6 jours de différenciation puis diminue progressivement jusqu'au stade 10 jours.

Les profils d'expression protéiques que nous avons obtenus sur la lignée C2C12 semblent en accord avec les études précédemment réalisées dans ce domaine. Dans la lignée de myoblastes de souris Sol8, Laurent et *al.* (472) ont mis en évidence que MyoD était exprimée de façon constitutive avant même la formation des myotubes alors que la myogénine apparaît plus tard. Son niveau d'expression présente un maximum au stade 5 jours. De la même façon, les travaux de Shimokawa et *al.* (473) dans les cellules de la lignée C2C12 indiquent que les ARNm de MyoD ne subissent pas de régulation durant la différenciation, et que les transcrits spécifiques de la myogénine augmentent de façon significative durant le processus. Il semblerait donc que ce facteur myogénique intervient dans les phénomènes tardifs de la myogenèse, comme cela a déjà été décrit (Rawls et Olson (474)).

En ce qui concerne Myf-5, ce facteur myogénique agirait en amont des autres membres de la famille des MRFs et précéderait le processus de différenciation terminale (Montarras et al. (475), Lindon et al. (476)). Il est fortement représenté dès le début de la différenciation et sa quantité diminue de façon importante après l'initiation de la fusion. De plus, les études réalisées par Shimokawa et al. (477) dans le même modèle cellulaire que le notre corroborent parfaitement nos résultats concernant Myf-5.

Outre l'évolution des facteurs myogéniques, nous avons aussi émis l'hypothèse que la μ -calpaïne pourrait intervenir sur le turn-over de certaines protéines du cytosquelette, substrats de cette protéase *in vitro*, telles que l'eitrine, la vimentine et la cavéoline 3. Nous avons, en conséquences, suivi dans un premier temps l'évolution de ces protéines au cours de la myogenèse.

Les résultats obtenus montrent que la quantité d'eitrine diminue à partir du deuxième jour de la mise en différenciation pour atteindre 80% de son taux basal et reste relativement stable jusqu'à la fin du processus. Le niveau de vimentine baisse tout au long de la fusion des myoblastes mais cette chute est moindre que celle enregistrée par Pieper et al. (478) sur la même lignée cellulaire. La cavéoline 3 apparaît au stade 5 jours pour rester constante jusqu'au dixième jour. Ces résultats sont confirmés par ceux de Scherer et al. (479) et Song et al. (480) qui montrent notamment que l'expression de la cavéoline 3 est brusquement induite alors que le processus de différenciation est déjà amorcé.

Les myoblastes de souris de la lignée C2C12 constituent un nouveau modèle cellulaire au sein du laboratoire. L'ensemble des résultats rapportés dans cette première partie a contribué à mieux caractériser le déroulement de la myogenèse dans ces cellules, et à déterminer la séquence d'apparition des acteurs du système protéolytique neutre calcium-dépendant et de certaines protéines spécifiques du muscle.

Ce travail représente donc une étude préliminaire nécessaire à la connaissance de notre modèle expérimental.

MISE EN PLACE DES SYSTEMES DE SUREXPRESSION DE LA μ -CALPAINE

La sous-unité catalytique de la μ -calpaine a été clonée dans les vecteurs d'expression de deux systèmes d'expression inductibles, le LacSwitch II et le Tet-Regulated Expression System. L'efficacité de l'insertion de cet ADN dans les plasmides, ainsi que son orientation ont été vérifiées par cartes restriction. Avant de réaliser la transfection stable des cellules de la lignée C2C12, la dose létale en antibiotiques permettant de sélectionner les myoblastes ayant intégré les vecteurs, a été déterminée : 650 μ g/ml pour l'hygromycine et 1000 μ g/ml pour la généticine. Ces valeurs correspondent à celles employées dans la littérature (Bisbal *et al.* (481), Mizuarai *et al.* (482)).

Pour le système LacSwitch II, le vecteur pCMVLacI a été transfecté dans les cellules myogéniques et l'expression qualitative de la protéine répresseur Lac I vérifiée. L'activité répressive du vecteur a été testée par ELISA pour son action sur le vecteur pOP13CAT qui possède le gène de la chloramphénicol acétyltransférase (CAT). Dès lors, les vecteurs pOPRSVI/MCS-*vide* et pOPRSVI/MCS- μ -calpaine ont été introduits dans les myoblastes. L'intégration de ces différents ADN dans le génome des myoblastes a été contrôlée par PCR et Southern-blot à partir de l'ADN génomique extrait de chacun des clones.

En ce qui concerne le Tet-Regulated Expression System, les vecteurs pTet-tTAK et pTet-Splice *vide* ou contenant le gène de la μ -calpaine humaine ont été co-transfectés dans les myoblastes. L'intégration et la fonctionnalité du premier vecteur ont été testées par sa capacité à induire la transcription d'un gène facilement détectable, la luciférase. Les autres vérifications ont été menées de la même façon que pour le système LacSwitch II.

L'induction des systèmes LacSwitch II et Tet a été réalisée respectivement par addition d'IPTG et par suppression de la doxycycline dans le milieu de culture des cellules C2C12. Le stade auquel l'induction a été réalisée, les doses utilisées ainsi que la durée du traitement ont été choisis selon les critères décrits dans le paragraphe II de la seconde partie des résultats.

Malgré de nombreuses tentatives, le système LacSwitch II ne nous a pas permis d'obtenir de surexpression de la μ -calpaine que ce soit en ARNm, protéines ou activités enzymatiques.

Par ailleurs, le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la protéase est augmenté de 60% dès 12 heures après l'induction du système Tet. Cette hausse est toujours remarquable 24 heures plus tard (45%). Vingt quatre heures après la suppression de l'antibiotique, la protéine

est surexprimée de 50%, le phénomène se prolongeant durant 36 heures (30% d'augmentation). Le dosage de l'activité protéolytique calcium-dépendante montre une hausse de l'ordre de 60% par rapport à son niveau basal.

Cette différence de fonctionnalité entre les deux systèmes inductibles pourrait s'expliquer par une action plus lente et moins efficace de l'IPTG par rapport à la doxycycline (Gossen et Bujard (483)). D'autre part, l'IPTG possède une constante d'affinité pour la protéine Lac I bien moindre que celle de la doxycycline pour la protéine tTA laissant présager que le système LacSwitch II est moins fiable que le système Tet .

Les expériences relatées dans cette deuxième partie du manuscrit n'aboutissent pas à des résultats importants en eux-mêmes. Cependant, toutes les étapes y figurant font partie intégrante du travail réalisé au cours de cette thèse et permettent de mettre en évidence les difficultés qui ont pu être rencontrées.

CONSEQUENCES DE LA SUREXPRESSION DE LA μ -CALPAINE

L'effet de la surexpression de la μ -calpaine a tout d'abord été observé sur le **phénomène de différenciation** proprement dit. La vitesse de fusion de ces myoblastes est plus rapide de 14% par rapport aux autres cellules de la lignée C2C12, 24 et 36 heures après l'induction du système. Le maximum de fusion est cependant conservé (60%).

Les conséquences de cette surexpression ont été visualisées en microscopie électronique où l'on note de profondes perturbations au niveau du métabolisme cellulaire avec une forte hétérogénéité du sarcoplasme, un développement important du réticulum endoplasmique granulaire et une raréfaction du système mitochondrial. Pour ce qui est de la machinerie contractile, un essai d'organisation est observé sous la membrane plasmique avec des filaments fins, parallèles les uns aux autres, s'alignant selon le grand axe des fibres. La progression vers le centre des fibres montre une désorganisation grandissante du cytosquelette qui ne présente plus d'organisation privilégiée.

L'effet du traitement sur les autres acteurs du système protéolytique calcium-dépendant (m-calpaine, calpastatine et p94) montre qu'aucune variation quantitative n'est induite lors de la surexpression de la μ -calpaine dans les myoblastes.

De nombreuses études, dont celles de Barnoy et *al.* (484) (485), montrent que le ratio calpaine/calpastatine est essentiel dans le contrôle de la fusion des myoblastes. Ici, le taux de

calpastatine n'évolue pas suite à la surexpression de la μ -calpaine suggérant que peut être la protéase pourrait interagir avec un régulateur de l'activité de la calpastatine et que celle-ci se trouverait alors dans l'incapacité de jouer son rôle. Aucune régulation de la μ -calpaine sur l'expression de la m-calpaine n'est observée, comme le suggérait déjà une étude de Thompson et *al.* (486) dans laquelle il montrait que la première ne protéolysait pas la seconde pour induire son activation. Il n'y aurait donc pas de contrôle réciproque d'une protéase sur l'autre dans le cas d'une modification quantitative de l'expression de ces calpaines.

En ce qui concerne le taux des facteurs myogéniques, les quantités de protéines MyoD et Myf-5 ne semblent pas varier alors que l'induction du système Tet entraîne des variations du niveau d'expression de la myogénine. Quarante huit heures après la suppression de la doxycycline du milieu de culture, la quantité de myogénine diminue de 59% dans les cellules traitées (par rapport aux cellules témoins). Ensuite, son niveau d'expression réaugmente pour rejoindre celui des cellules non traitées à 60 heures. Une action directe ou indirecte de la μ -calpaine sur la myogénine peut être envisagée.

- la myogénine est un substrat de la μ -calpaine.

Parmi les nombreuses fonctions des calpaines ubiquitaires, l'une d'elle serait sa participation à la régulation de la transcription. En effet, la dégradation de certains facteurs de transcription (c-jun, c-fos) ou de leurs inhibiteurs (I κ B) a pu être mise en évidence *in vitro* (Pariat et *al.* (487), Shumway et *al.* (488)). Au vu de ces observations, il ne fait aucun doute que la μ -calpaine puisse agir sur les facteurs de transcription myogéniques et être impliquée dans le même type de régulation au niveau du muscle. A ce titre, la myogénine pourrait être un substrat de la μ -calpaine *in vivo*. Il serait judicieux de vérifier cette hypothèse en surexprimant la protéase en présence de chacun des facteurs myogéniques dans des cellules n'en exprimant pas (fibroblastes,...). L'effet de la μ -calpaine sur les membres de la famille MRF pourrait être observé grâce à l'utilisation d'un gène reporter sous la dépendance de séquences régulatrices contenant des sites E-box (sites de fixation des facteurs myogéniques). Si les résultats s'avéraient positifs, il serait alors intéressant de déterminer comment et à quel moment de la différenciation se fait cette régulation.

Plusieurs études (Wright et *al.* (489), Hasty et *al.* (490), Nabeshima et *al.* (491)) montrent que la myogénine est essentielle à la formation des myotubes notamment au début du processus. Une diminution de son expression a donc des conséquences sur la fusion des myoblastes ; il est possible que le ralentissement de la vitesse de fusion 48 heures après l'induction du

système Tet, ainsi que la restauration du maximum de fusion et la baisse de la quantité de myogénine au même stade soient liés.

Le fait que seule la myogénine soit touchée par la surexpression de la μ -calpaine, sans vraisemblablement d'ajustement des autres facteurs MRFs, indique que l'intervention de chacun de ces facteurs de transcription est spécifique, non redondante et qu'elle ne peut faire l'objet d'une substitution par un autre de ces facteurs (Dedieu et al. (492)).

- Les effets observés ne sont pas dus à une action directe de la protéase sur la myogénine. Dans ce cas, l'augmentation de la quantité de protéase pourrait entraîner des modifications de l'expression de certains régulateurs des facteurs myogéniques ou bien encore modifier l'activité d'autres systèmes protéolytiques intervenant dans le turn-over des MRFs.

L'action concertée des quatre acteurs de la famille des MRFs au cours de la myogenèse est assez complexe et nécessite la présence de protéines régulatrices de la famille MEF-2. En ce qui concerne la régulation de l'expression de ces facteurs, les quelques hypothèses émises à l'heure actuelle proviennent de travaux réalisés *in vitro*. En quelques mots, MyoD et Myf-5 activeraient la myogénine, qui à son tour agirait sur MRF4. MEF2 serait capable de réguler positivement la myogénine, mais dans certaines conditions seulement (Yun et Wold (493)). Plusieurs molécules sont impliquées de façon directe ou indirecte dans l'activation de l'expression de la myogénine. Afin de comprendre quel rôle pourrait jouer la μ -calpaine dans ces voies de régulation, il serait intéressant d'étudier les variations de ces molécules suite à la surexpression de la protéase.

Une autre hypothèse concernant l'action indirecte de la μ -calpaine sur l'expression de la myogénine serait que la protéase agirait sur l'activité ou l'expression d'un autre système protéolytique (protéasome, cathepsines, caspases), celui-ci intervenant au niveau de la dégradation de la myogénine. Il en résulterait une augmentation de catabolisme du facteur de transcription. Ainsi Mugita et al. (494) ont montré que le protéasome intervenait dans la régulation transcriptionnelle de la myogénine. La μ -calpaine serait alors impliquée dans la régulation de l'activité protéolytique intracellulaire et son dysfonctionnement dans le cas des dystrophies musculaires pourrait entraîner des dégradations incontrôlées au sein des myofibrilles. L'étude de ces différentes voies de dégradation intracellulaires après surexpression de la μ -calpaine, devrait se révéler très informative.

La dernière étape de cette étude a consisté à observer les effets de la surexpression de la μ -calpaine sur la quantité de certaines protéines du cytosquelette. Suite à l'induction du système, l'actine, l'annexine, la desmine, la dystrophine, la fibronectine, la spectrine et la taline ne voient pas leurs niveaux d'expression varier. Plusieurs études ont pourtant mis en évidence que certaines de ces protéines étaient clivées par les calpaines *in vivo*. C'est le cas de l'annexine dans le muscle lisse (Babiyshuk et al. (495)). D'autre part, il a été montré qu'elles étaient impliquées dans le développement de myopathies comme par exemple la dystrophine dans la myopathie de Duchenne (Roberts et Dickson (496)) ou la desmine dans d'autres types de dystrophies (Goebel (497)).

La quantité de la protéine **ezrine** diminue de 68 et 17% par rapport aux cellules témoins 48 et 60 heures respectivement après le début de l'induction. Shcherbina et al. (498) ont montré dans les cellules sanguines que l'ezrine, contrairement à la moesine et à la radixine, était sensible au clivage par la protéase ce qui permettait de la distinguer des deux autres .

Pour ce qui est de la **vimentine**, elle est à 36% de son taux normal 48h après l'induction de la surexpression de la μ -calpaine. La **cavéoline 3** présente également une modification significative d'expression suite à la surexpression de μ -calpaine. A 48 heures, elle n'est plus qu'à 24% de son niveau basal et à 36 et 60 heures elle atteint 83 et 79% du taux initial. L'ezrine, la vimentine et la cavéoline 3 seraient donc des substrats, directs ou indirects, de la μ -calpaine *ex vivo*.

Les mêmes hypothèses que dans le cas de la myogénine peuvent alors être émises. En ce qui concerne un mode d'action indirect, de très nombreuses suppositions peuvent être formulées, la μ -calpaine pouvant interagir avec de nombreuses protéines ou systèmes protéolytiques, eux-mêmes régulant l'expression d'autres éléments. Ainsi, elle pourrait hydrolyser la cavéoline 3 qui possède une activité inhibitrice sur la PKC α (Prevostel et al. (499)) à l'origine de régulation par phosphorylation. De façon similaire, certaines pro-caspases (-3, -7, -12) sont clivées par les calpaines entraînant leurs maturations et activations (Blomgren et al. (500), Nakagawa et Yuan (501)). Ces caspases pourraient alors cliver certains des substrats des calpaines dont la vimentine (Ando et al. (502)).

En d'autres termes, la dérégulation de la protéase s'accompagne d'une cascade d'événements eux-mêmes intervenant dans des boucles de régulation variées.

L'ezrine et la vimentine sont des éléments essentiels dans le maintien des différents organites, dans la forme et la structure cellulaires et participent, de part leur positionnement, à

l'organisation du cytosquelette. La vimentine a souvent été associée à la régénération du tissu squelettique lors des dystrophies musculaires et est utilisée comme marqueur dans les études histologiques (Brasseur et al. (503)). Galbiati et al. (504) ont montré que la cavéoline 3 avait un rôle décisif dans la fusion des myoblastes. Leurs dégradations, suite à la surexpression de la μ -calpaine, auraient des répercussions sur l'ultrastructure de la cellule ainsi que sur la différenciation des myoblastes. Ces conséquences ont été observées en microscopie électronique où de profondes altérations dans l'organisation du cytosquelette et dans la cytologie des myoblastes ont été notées. Rapprochons ces faits d'études où une sous-expression de la cavéoline 3 (Galbiati et al. (505)) a été impliquée dans la LGMD1C (Limb-Girdle Muscular Dystrophy).

Pour ce qui est de la discrimination du rôle des μ - et m-calpaines lors de la fusion des myoblastes, nous constatons que les deux protéases ne dégradent pas les mêmes substrats. Dourdin et al. (506) ont mis en évidence que, lors de la fusion des myoblastes, la m-calpaine participait à ce processus en dégradant la fibronectine. Une réduction importante de la quantité de fibronectine à la surface des myoblastes a été montrée (Hynes et al. (507), Walsh et al. (508)). La m-calpaine, pour ce faire, est externalisée de la cellule et a été localisée dans des sites proches de cette protéine (Brustis et al. (509)). Les résultats que nous venons d'exposer démontrent que la fibronectine n'est pas un substrat de la μ -calpaine, celle-ci n'ayant de plus pas une localisation lui permettant d'interagir avec cette protéine. D'autre part, la desmine et la taline sont dégradées *in vivo* par la m-calpaine lors de la différenciation alors que la vimentine ne constitue pas, dans ces conditions, un substrat pour la protéase (Dourdin et al. (510), Elamrani et al. (511)). Un traitement avec des oligonucléotides antisens dirigés contre la m-calpaine entraîne une augmentation des quantités de desmine, taline et fibronectine alors que celles de vimentine reste stables. Pour ce qui est de la μ -calpaine, des observations inverses ont été faites à savoir qu'elle possédait une activité protéolytique *in vivo* sur la vimentine mais pas sur les trois autres protéines. En résumé, nous pouvons affirmer que les μ - et m-calpaines possèdent, *in vivo*, une spécificité de substrats l'une par rapport à l'autre.

En conclusion, cette étude a été mise en œuvre avec comme objectif majeur de contribuer à l'étude du rôle biologique de la μ -calpaine au cours de la différenciation musculaire. Cependant, les nombreux problèmes rencontrés au cours de la réalisation de ce

travail n'ont pas permis de mener à bien tous les projets envisagés. Par conséquent, de nombreuses perspectives restent ouvertes.

Il sera en effet intéressant d'observer les effets de la surexpression de la μ -calpaine sur d'autres substrats potentiels de la protéase ou sur les autres systèmes protéolytiques intracellulaires afin de confirmer les hypothèses émises au cours de ce travail.

Suite aux études de microscopie électronique, il sera très informatif de voir en immunofluorescence, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la μ -calpaine et diverses protéines du cytosquelette, le devenir de celles-ci après l'induction de la surexpression.

Le mécanisme d'action moléculaire de la μ -calpaine reste donc encore à élucider, en particulier en ce qui concerne son implication dans l'organisation myofibrillaire, la régulation de son activité protéolytique et l'identification des protéines substrats. Certaines de ces expériences sont déjà en cours au laboratoire.

La possible surexpression de la μ -calpaine par le biais du système inductible Tet a ouvert une nouvelle approche prometteuse pour continuer l'étude de cette protéase au cours de la différenciation musculaire et en conséquence contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans l'étiologie de certaines myopathies.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Affar E.B., Germain M., Winstall E., Vodenicharov M., Shah R.G., Salvesen G.S. and Poirier G.G. (259)

Caspase-3-mediated processing of poly(ADP-ribose) glycohydrolase during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2001 ; 276(4):2935-2942.

Akkila W.M., Chambers R.L., Ornatsky O.I. and McDermott J.C. (436)

Molecular cloning of up-regulated cytoskeletal genes from regenerating skeletal muscle: potential role of myocyte enhancer factor 2 proteins in the activation of muscle-regeneration-associated genes. *Biochem. J.* 1997 ; 325 (Pt 1) :87-93.

Ambrosini G., Adida C. and Altieri D.C. (268)

A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 1997 ; 3(8):917-921.

Andersson M., Sjostrand J., Andersson A.K., Andersen B. and Karlsson J.O. (222)

Calpains in lens epithelium from patients with cataract. *Exp. Eye. Res.* 1994 ; 59(3) :359-364.

Ando Y., Miyachi Y., Imamura S., Kannagi R. and Murachi T. (278) (502)

Purification and characterization of calpains from pig epidermis and their action on epidermal keratin. *J. Invest. Dermatol.* 1988 ; 90(1) : 26-30.

Andresen K., Tom T.D. and Strand M. (75)

Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266 (23) :15085-15090.

Aoki K., Imajoh S., Ohno S., Emori Y., Koike M., Kosaki G. and Suzuki K. (55) (365) (366)

Complete amino-acid sequence of the large subunit of the low Ca^{2+} -requiring form of human Ca^{2+} -activated neutral protease (μ CANP) deduced from its cDNA sequence. *F.E.B.S. Lett.* 1986 ; 3929 :205-212.

Ariyoshi H., Shiba E., Sakon M., Kambayashi J., Yoshida K., Kawashima S. and Mori T. (198)

Translocation of human platelet calpain-I. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993 ; 30(1) :63-72.

Arthur J.S. and Crawford C. (121)

Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996 ; 1293(2) :201-206.

Arthur J.S., Greer P.A. and Elce J.S. (59)

Structure of the mouse calpain small subunit gene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998 ; 1388 :247-252.

Ashkenazi A. and Dixit V.M. (253)

Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998 ; 281(5381):1305-1308.

Azanza J.L., Raymond J., Robin J.M., Cottin P. and Ducastaing A. (178)

Purification and some physico-chemical and enzymic properties of a calcium ion-activated neutral proteinase from rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* 1979 ; 183(2) :339-347.

Babiychuk E.B., Monastyrskaya K., Burkhard F.C., Wray S. and Draeger A. (495)

Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *F.A.S.E.B. J.* 2002 ; 16(10) :1177-1184.

Baki A., Tompa P., Alexa A., Molnar O. and Friedrich P. (119)

Autolysis parallels activation of mu-calpain. *Biochem. J.* 1996 ; 318 (Pt 3) :897-901.

Balcerzak D., Poussard S., Brustis J.J., Soriano M., Cottin P. and Ducastaing A. (343) (356) (446) (461)

An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion. *J. Cell. Biol.* 1995 ; 108 : 2077-2082.

Balcerzak D., Cottin P., Poussard S., Cucuron A., Brustis J.J. and Ducastaing A. (352) (382) (445) (467)

Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion. *Eur. J. Cell. Biol.* 1998 ; 75 :247-253.

Barkley M.D. and Bourgeois S. (420)

In *The operon*, eds. Miller J.H. and Reznikoff W.S., 1980 (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY), pp. 177-220.

Barnoy S., Glasner T. and Kosower N.S. (349) (383) (384) (462) (468)

The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996 ; 220(3) :933-938.

Barnoy S., Glaser T. and Kosower N.S. (350) (459)

Calpain and calpastatin in myoblast differentiation and fusion: effects of inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997 ; 1358(2) :181-188.

Barnoy S., Glaser T. and Kosower N.S. (485)

The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998 ; 1402(1) :52-60.

Barnoy S., Supino-Rosin L. and Kosower N.S. (353) (484)

Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability. *Biochem. J.* 2000 ; 351 Pt 2 :413-420.

Barret A.J. (10)

Introduction to the history and classification of tissue proteinases. In A.J. BARRET (ed) *Proteinases in mammalian cells and tissues*. Elsevier/North Holland. 1987 ; 1-19.

Bechet D.M., Ferrara M.J., Mordier S.B., Roux M.P., Deval C.D. and Obled A. (14)

Expression of lysosomal cathepsin B during calf myoblast-myotube differentiation. Characterization of a cDNA encoding bovine cathepsin B. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266 :14104-14112.

Benezra R., Davis R.L., Lockshon D., Turner D.L. and Weintraub H. (303) (329)

The protein Id : a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell.* 1990 ; 61 :49-59.

Berti P.J. and Storer A.C. (46)

Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J. Mol. Biol.* 1995 ; 246 : 273-283.

Bisbal C., Silhol M., Laubenthal H., Kaluza T., Carnac G., Milligan L., Le Roy F. and Salhezada T. (379) (413) (415) (481)

The 2'-5' oligoadenylate/Rnase L/Rnase L inhibitor pathway regulates both MyoD mRNA stability and muscle cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 2000 ; 20 : 4959-4969.

Blanchard H., Groshulski P., Li Y., Arthur J.S., Davies P.L., Elce J.S. and Cygler M. (80)

Structure of calpain Ca²⁺-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca²⁺-induced conformational changes. *Nat. Struct. Biol.* 1997 ; 4 (7) : 532-538.

Blau H.M., Chiu C.P. and Webster C. (354) (377)

Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell.* 1983 ; 32 : 1171-1180.

Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J.O., Leverin A.L., Bahr B.A., Mallard C. and Hagberg H. (108) (271) (500)

Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J. Biol. Chem.* 2001 ; 276(13) : 10191-10198.

- Bober E., Lyons G.E., Braun T., Cossu G., Buckingham M. and Arnold H.H.** (308)
The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell. Biol.* 1991 ; 113(6) :1255-1265.
- Boldin M.P., Goncharov T.M., Goltsev Y.V. and Wallach D.** (250)
Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996 ; 85(6):803-815.
- Bond J.S. and Buttler P.E.** (11)
Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.* 1987 ; 58 : 333-364.
- Bonifacino J.S.** (29)
Reversal of fortune for nascent proteins. *Nature.* 1996 ; 384(6608) :405-406.
- Bootman M.D. and Berridge M.J.** (35)
The element principles of calcium signaling. *Cell.* 1995 ; 83 :675-678.
- Branca D., Gugliucci A., Bano D., Brini M. and Carafoli E.** (144)
Expression, partial purification and functional properties of the muscle-specific calpain isoform p94. *Eur. J. Biochem.* 1999 ; 265 :839-846.
- Brasseur G., Onolfo J.P., Copin H., Lepercqey F. and Barbet J.P.** (503)
Degeneration and regeneration of striated skeletal muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy *Morphologie.* 1997 ; 81(252) : 9-13.
- Braun T., Buschhausen-Dencker G., Bober E., Tannich E. and Arnold H.H.** (300)
A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *E.M.B.O. J.* 1989 ; 8 :701-709.
- Braun T., Bober E., Winter B., Rosenthal N. and Arnold H.H.** (392) (394)
Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors : evidence for a gene cluster on chromosome 12. *E.M.B.O. J.* 1990 ; 9 : 821-831.
- Braun T., Rudnicki M.A., Arnold H.H. and Jaenisch R.** (310)
Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell.* 1992 ; 71(3) :369-382.
- Breton M., Li Z.L., Paulin D., Harris J.A., Rieger F., Pincon-Raymond M. and Garcia L.** (289)
Myotube driven myogenic recruitment of cells during in vitro myogenesis. *Dev. Dyn.* 1995 ; 202(2) :126-136.
- Brown E.M., Vassilev P.M. and Hebert S.C.** (36)
Calcium ions extracellular messengers. *Cell.* 1995 ; 83 :679-682.
- Brown N. and Crawford C.** (115)
Structural modifications associated with the change in Ca²⁺ sensitivity on activation of m-calpain. *F.E.B.S. Lett.* 1993 ; 322(1) :65-68.
- Brustis J.J., Elamrani N., Balcerzak D., Safwate A., Soriano M., Poussard S., Cottin P. and Ducastaing A.** (194) (509)
Rat myoblast fusion requires exteriorized m-calpain activity. *Eur. J. Cell. Biol.* 1994 ; 64(2) :320-327.
- Buckingham M.E.** (306) (309)
Making muscle in mammals. *Trends Genet.* 1992 ; 8 :144-148.
- Busch W. A., Stromer M.H., Goll D.E. and Suzuki A.** (49)
Ca²⁺ specific removal of Z lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 1972 ; 52 :367-381.

Carafoli E. and Molinari M. (130)

Calpain: a protease in search of a function? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 ; 247(2) :193-203.

Carillo S., Pariat M., Jariel-Encontre I., Steff A.M. and Piechaczyk M. (3) (8)

Le catabolisme protéique intracellulaire : une fonction biologique majeure. Partie I : les mécanismes de dégradation. *Medecine/Sciences.* 1995 ; 11 : 723-734.

Carillo S., Pariat M., Steff A.M., Jariel-Encontre I., Poulat F., Berta P. and Piechaczyk M. (92)

PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein. *Biochem. J.* 1996 ; 313 :245-251.

Carragher N.O., Fincham V.J., Riley D. and Frame M.C. (217) (220)

Cleavage of Focal Adhesion Kinase by Different Proteases during Src-regulated Transformation and Apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J. Biol. Chem.* 2001 ; 276(6) :4270-4275.

Chen C.M., Kraut N., Groudine M. and Weintraub H. (331)

I-mf, a novel myogenic repressor, interacts with members of the MyoD family. *Cell.* 1996 ; 86(5) :731-741.

Chen J., Nagayama T., Jin K., Stetler R.A., Zhu R.L., Graham S.H. and Simon R.P. (265)

Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 1998 ; 18(13):4914-4928.

Chiang H.L. and Dice J.F. (9)

Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* 1988 ; 263 :6797-6805.

Chiquet M., Eppenberger H.M. and Turner D.C. (287)

Muscle morphogenesis: Evidence for an organizing function of exogenous fibronectin. *Dev. Biol.* 1981 ; 88(2) :220-235.

Cho W.J., Kim E.J., Lee S.J., Kim H.D., Shin H.J. and Lim W.K. (458)

Involvement of SPARC in *in vitro* differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000 ; 271 : 630-634.

Choi E.K., Rhee Y.H., Park H.J., Ahn S.D., Shin K.H. and Park K.K. (110)

Effect of protein kinase C inhibitor (PKCI) on radiation sensitivity and c-fos transcription. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001 ; 49(2) : 397-405.

Chomczynski P. and Sacchi N. (363)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987 ; 162 : 156-159.

Chou J.J., Matsuo H., Duan H. and Wagner G. (252)

Solution structure of the RAIDD CARD and model for CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell.* 1998 ; 94(2):171-180.

Chua B.T., Guo K. and Li P. (109) (273)

Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275(7) : 5131-5135.

Ciechanover A. (25)

The ubiquitin-mediated proteolytic pathway : mechanisms of action and cellular physiology. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* 1994 ; 375 (a) : 565-581.

Cifuentes-Diaz C., Nicolet M., Alameddine H., Goudou D., Dehaupas M., Rieger F. and Mege R.M. (295)

M-cadherin localization in developing adult and regenerating mouse skeletal muscle: possible involvement in secondary myogenesis. *Mech. Dev.* 1995 ; 50(1) :85-97.

Cong J., Goll D.E., Peterson A.M. and Kapprell H.P. (112) (124)

The role of autolysis in activity of the Ca²⁺-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). *J. Biol. Chem.* 1989 ; 264(17) :10096-10103.

Cong M., Goll D.E. and Antin P.B. (165)

cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998 ; 1443 :186-192.

Coolican S.A. and Hathaway D.R. (123)

Effect of L- α -phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca²⁺-dependent protease. *J. Biol. Chem.* 1984 ; 259 :11627-11630.

Cottin P., Vidalenc P.L. and Ducastaing A. (158)

Ca²⁺-dependent association between a Ca²⁺-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. *F.E.B.S. Lett.* 1981 ; 136(2) :221-224.

Cottin P., Vidalenc P.L., Merdaci N. and Ducastaing A. (162)

Evidence for non-competitive inhibition between two calcium-activated neutral proteinase and its specific inhibitor. *Biochem. Biophys. Acta.* 1983 ; 743 :299-302.

Cottin P., Poussard S., Desmazes J.P., Georgescauld D. and Ducastaing A. (113) (417)

Free calcium and calpain I activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1991 ; 1079 :139-145.

Cottin P., Poussard S., Mornet D., Brustis J.J., Mohammadpour M., Leger J. and Ducastaing A. (96)

In vitro digestion of dystrophin by calcium-dependent proteases, calpains I and II. *Biochimie.* 1992 ; 74 :565-570.

Cottin P., Brustis J.J., Poussard S., Elamrani N., Broncard S. and Ducastaing A. (218) (341) (380) (407) (434) (448) (464)

Ca²⁺-dependent protease (calpains) and muscle cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994 ; 1223 :170-178.

Croall D.E. and DeMartino G.N. (94) (155)

Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 1991 ; 71(3) :813-847.

Cryns V. and Yuan J. (245) (255)

Proteases to die for. *Genes. Dev.* 1998 ;12(11):1551-1570.

Dargelos E., Dedieu S., Moyen C., Poussard S., Veschambre P., Brustis J.J. and Cottin P. (455)

Characterization of the calcium-dependent proteolytic system in a mouse muscle cell line. *Mol. Cell. Biochem.* 2002 ; 231(1-2) :147-154.

Dargelos E., Moyen C., Dedieu S., Veschambre P., Poussard S., Vuillier-Devillers K., Brustis J.J. and Cottin P. (414)

Development of an inducible system to assess p94 (CAPN3) function in cultured muscle cells. *J. Biotechnol.* 2002 ; 96(3) : 271-279.

David L.L., Shearer T.R. and Shih M. (221)

Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J. Biol. Chem.* 1993 ; 268(3) :1937-1940.

Davis R.L., Weintraub H. and Lassar A.B. (299)

Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987 ; 51(6) :987-1000.

Dayton W.R., Goll D.E., Zeece M.G., Robson R.M. and Reville W.J. (51) (176)

A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry*. 1976 ; 15(10) :2150-2158.

Dayton W.R., Schollmeyer J.V., Lepley R.A. and Cortes L.R. (185)

A calcium-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Isolation of a low-calcium-requiring form of the protease. *Biochim. Biophys. Acta*. 1981 ; 659(1) :48-61.

Dear N., Matena K., Vigron M. and Boehm T. (65) (368)

A new subfamily of vertebrates calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics*. 1997 ; 45 :175-184.

Dedieu S., Dourdin N., Dargelos E., Poussard S., Veschambre P., Cottin P. and Brustis J.J. (348)

Calpain and myogenesis: development of a convenient cell culture model. *Biol. Cell*. 2002 ; 94(2) :65-76.

Dedieu S., Mazeret G., Cottin P. and Brustis J.J. (317) (492)

Involvement of myogenic regulator factors during fusion in the cell line C2C12. *Int. J. Dev. Biol.* 2002 ; 46(2) : 235-241.

delacruz W.P., Friesen P.D. and Fisher A.J. (267)

Crystal structure of baculovirus P35 reveals a novel conformational change in the reactive site loop after caspase cleavage. *J. Biol. Chem.* 2001 ; 276(35):32933-32939.

DeMartino G.N. and Croall D.E. (182)

Purification and characterization of a calcium-dependent protease from rat liver. *Biochemistry*. 1983 ; 22(26) :6287-6291.

Di Lisa F., De Tullio R., Salamino F., Barbato R., Melloni E., Siliprandi N., Schiaffino S. and Pontremoli S. (99)

Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *Biochem. J.* 1995 ; 308 (Pt 1) :57-61.

Douglas E. Kelly. (424)

Myofibrillogenesis and Z-band differentiation. *Anat. Rec.* 1969 ; 163 : 403-426.

Dourdin N., Brustis J.J., Balcerzak D., Elamrani N., Poussard S., Cottin P. and Ducastaing A. (345) (506)

Myoblast fusion requires fibronectin degradation by exteriorized m-calpain. *Exp. Cell. Res.* 1997 ; 235(2) : 385-394.

Dourdin N., Balcerzak D., Brustis J.J., Poussard S., Cottin P. and Ducastaing A. (97) (347) (510)

Potential m-calpain substrates during myoblast fusion. *Exp. Cell. Res.* 1999 ; 246 : 433-442.

Du X., Saido T.C., Tsubuki S., Indig F.E., Williams M.J. and Ginsberg M.H. (103)

Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit. *J. Biol. Chem.* 1995 ; 270(44) :26146-26151.

Dunn W.A. (4)

Studies on the mechanism of autophagy : formation of the autophagic vacuole. *J. Cell. Biol.* 1990 ; 110 : 1923-1933.

Dunn W.A. (5)

Studies on the mechanism of autophagy : maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell. Biol.* 1990 ; 110 : 1935-1945.

Dutson T.R. and Lawrie R.A. (12)

Release of lysosomal enzymes during post-mortem conditioning and their relationship to tenderness. *Food Technol.* 1974 ; 9 : 43-50.

Dutt P., Arthur J.S., Croall D.E. and Elce J.S. (141)

m-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium. *F.E.B.S. Lett.* 1998 ; 436(3) :367-371.

Ebisui C., Tsujinaka T., Kido Y., Iijima S., Yano M., Shibata H., Tanaka T. and Mori T. (338) (460)

Role of intracellular proteases in differentiation of L6 myoblast cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1994 ; 32(3) :515-521.

Ebisui C., Tsujinaka T., Morimoto T., Fujita J., Ogawa A., Ishido K., Kominami E., Tanaka K. and Monden M. (13) (31)

Changes of proteasomes and cathepsins activities and their expression during differentiation of the C2C12 myoblasts. *J. Biochem.* 1995 ; 117 :1088-1094.

Edmonson D.G. and Olson E.N. (393)

A gene with homology to the myc similarity region of MyoD is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Gene Dev.* 1989 ; 3 : 628-640.

Edmunds T., Nagainis P.A., Sathe S.K., Thompson V.F. and Goll D.E. (114)

Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991 ; 1077(2) :197-208.

Elamrani N., Brustis J.J., Dourdin N., Balcerzak D., Poussard S., Cottin P. and Ducastaing A. (346) (511)

Desmin degradation and Ca²⁺-dependent proteolysis during myoblast fusion. *Biol. Cell.* 1995 ; 85(2-3) : 177-183.

Elce J.S., Davies P.L., Hegadorn C., Maurice D.H. and Arthur JS. (83) (140)

The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation. *Biochem. J.* 1997 ; 326 (Pt1) :31-38.

Elce J.S., Hegadorn C. and Arthur J.S.C. (126)

Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272 :11268-11275.

Emori Y., Kawasaki H., Imajoh S., Kawashima S. and Suzuki K. (57) (190)

Isolation and sequence analysis of cDNA clones for the small subunits of rabbit calcium-dependent protease. *J. Biol. Chem.* 1986 ; 261 :9472-9476.

Emori Y., Ohno S., Tobita M. and Suzuki K. (73)

Gene structure of calcium-dependent protease retains the ancestral organization of the calcium-binding protein gene. *F.E.B.S. Lett.* 1986 ; 194(2) :249-252.

Emori Y. and Saigo K. (219)

Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during embryonic development of drosophila. *J. Biol. Chem.* 1994 ; 269 :25137-25142.

Engelman J.A., Zhang X., Galbiati F., Volonte D., Sotgia F., Pestell R.G., Minetti C., Scherer P.E., Okamoto T. and Lisanti M.P. (440)

Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer disease, and muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 1998 ; 63(6) : 1578-1587.

Ertbjerg P., Lawson M.A. and Purslow P.P. (196)

Epinephrine upregulates calpain activity in cultured C2C12 muscle cells. *Biochimie.* 2000 ; 82(3) :197-201.

Ewton D.Z., Roof S.L., Magri K.A., McWade F.J. and Florini J.R. (322)

IGF-II is more active than IGF-I in stimulating L6A1 myogenesis: greater mitogenic actions of IGF-I delay differentiation. *J. Cell. Physiol.* 1994 ; 161(2) :277-284.

Fernandes-Alnemri T., Armstrong R.C., Krebs J., Srinivasula S.M., Wang L., Bullrich F., Fritz L.C., Trapani J.A., Tomaselli K.J., Litwack G. and Alnemri E.S. (263)

In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996 ; 93(15):7464-7469.

Fieck A., Wyborski D.L. and Short J.M. (357)

Modifications of the E.coli repressor for expression in eukaryotic cells : effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res.* 1992 ; 7 : 1785-1791.

Fineschi B. and Miller J. (7)

Endosomal proteases and antigene processing. *Trends Biochem. Sci.* 1997 ; 22 : 377-382.

Fischman D.A. (422)

An electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 1967 ; 32 : 557.

Fischman D.A. (423)

The synthesis and assembly of myofibrils in embryonic muscle. In Current topics in developmental biology, ed A.A. Moscona and A. Monroy, 1970, vol 5 p235. Academic Press, New York.

Fougerousse F., Bullen P., Herasse M., Lindsay S., Richard I., Wilson D., Suel L., Durand M., Robson S., Abitbol M., Beckmann J. and Strachan T. (202)

Human-mouse differences in the embryonic expression patterns of developmental control genes and disease genes. *Hum. Mol. Genet.* 2000 ; 9 :165-173.

Fukuda S., Harada K., Kunimatsu M., Sakabe T. and Yoshida K. (231)

Postischemic reperfusion induces alpha-fodrin proteolysis by m-calpain in the synaptosome and nucleus in rat brain. *J. Neurochem.* 1998 ; 70(6) :2526-2532.

Fulton A.B., Prives J., Farmer S.R. and Penman S. (298) (344)

Developmental reorganization of the skeletal framework and its surface lamina in fusing muscle cells. *J. Cell. Biol.* 1981 ; 91(1) :103-112.

Galbiati F., Volonte D., Engelman J.A., Scherer P.E. and Lisanti M.P. (400) (443) (505)

Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274(42) : 30315-30321.

Galbiati F., Razani B. and Lisanti M.P. (399) (439) (504)

Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol. Med.* 2001 ; 7(10) : 435-441.

Garcia-Calvo M., Peterson E.P., Leiting B., Ruel R., Nicholson D.W. and Thornberry N.A. (266)

Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273(49):32608-32613.

Gardrat F., Montel V., Raymond J. and Azanza J.L. (32)

Proteasome and myogenesis. *Mol. Biol. Rep.* 1997 ; 24 :77-81.

Garret C., Cottin P., Dufourcq J. and Ducastaing A. (78)

Evidence for a Ca²⁺-independent association between calpain II and phospholipid vesicles. *F.E.B.S. Lett.* 1988 ; 227(2) :209-214.

Glukhova M.A. and Thiery J.P. (297)

Fibronectin and integrins in development. *Semin. Cancer. Biol.* 1993 ; 4(4) :241-249.

Goebel H.H. (497)

Desmin-related neuromuscular disorders. *Muscle Nerve.* 1995 ; 18(11) :1306-1320.

Goldberg A.L. and Rock K.L. (16)

Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature.* 1992 ; 357 :375-378.

Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G. and Zalewska T. (70) (111) (116)

Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin ? *BioEssays.* 1992 ; 14 :549-556.

Gossen M. and Bujard H. (359) (418) (483)

Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1992 ; 89(12) : 5547-5551.

Graham S.L. and Van Der Eb A.J. (362)

A new technic for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973 ; 52 : 456-467.

Graham-Siegenthaler K., Gauthier S., Davies P.L. and Elce J.S. (138)

Active recombinant rat calpain II. Bacterially produced large and small subunits associate both *in vivo* and *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 1994 ; 269 :30457-30460.

Gross W.O. (428)

Z-line elementary bodies. Morphological study of sarcomere genesis in chick heart myocytes. *J. Submicr. Cytol.* 1977 ; 9 : 285-298.

Guroff G. (48)

A neutral calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 1964 ; 269 (48) :30457-30460.

Harris A.S., Croall D.E. and Morrow J.S. (89)

Calmodulin regulates fodrin susceptibility to cleavage by calcium-dependent protease I. *J. Biol. Chem.* 1989 ; 264 :17401-17408.

Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmondson D.G., Venuti J.M., Olson E.N. and Klein W.H. (312) (397) (490)

Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 1993 ; 364(6437) : 501-506.

Haylett T. and Thillo L. (6)

Endosome fusion at low temperatures. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266 : 8322-8327.

Hebrok M., Fuchtbauer A. and Fuchtbauer E.M. (330)

Repression of muscle specific gene activation by the murine twist protein. *Exp. Cell. Res.* 1997 ; 232 :295-303.

Herasse M., Fougerousse F., Stockholm D., Beckmann J.S. and Richard I. (201)

Calpaïne 3 et dystrophie musculaire des ceintures de type 2A. *m/s.* 1999 ; 15 :1428-1434.

Herasse M., Ono Y., Fougerousse F., Kimura E., Stockholm D., Beley C., Montarras D., Pinset C., Sorimachi H., Suzuki K., Beckmann J.S. and Richard I. (200)

Expression and fonctionnal characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptionnal and posttranscriptionnal events. *Mol. Cell. Biol.* 1999 ; 19 :4047-4055.

Herschko A. and Ciechanover A. (34)

The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 1992 ; 61 :761-807.

Holtzer H., Abbot J. and Lash J. (282)

On the formation of multinucleated myotubes. *Anat. Rec.* 1958 ; 567.

Holtzman E. (2)

Lysosomes. *New York Plenum Press.* 1989.

Hosfield C.M., Elce J.S., Davies P.L. and Jia Z. (82)

Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *E.M.B.O. J.* 1999 ; 18(24) :6880-6889.

Hough R., Pratt G. and Reichsteiner M. (21)

Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 1987 ; 262 :8303-8313.

Hu M.C and Davidson N. (405)

The inducible lac operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell.* 1987 ; 48(4) :555-566.

Hu S., Vincenz C., Ni J., Gentz R. and Dixit V.M. (269)

I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272(28):17255-17257.

Huang J. and Forsberg N.E. (412)

Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998 ; 95(21) : 12100-12105.

Hussain T., Devi N.G., Kumari C.K. and Anandaraj M.P. (227) (386) (452)

Deletion analysis & calpain status for carrier detection in a family with Duchenne muscular dystrophy. *Indian J. Med. Res.* 1998 ; 108:93-97.

Hynes R.O., Martin G.S., Shearer M., Critchley D.R. and Epstein C.J. (507)

Viral transformation of rat myoblasts: effects on fusion and surface properties. *Dev. Biol.* 1976 ; 48(1) : 35-46.

Ikura M. (37) (39)

Calcium binding and conformational response in EF-Hand proteins. *Trends. Biochem. Sci.* 1996 ; 21 :14-17.

Imajoh S., Kawasaki H. and Suzuki K. (77) (122)

The amino-terminal hydrophobic region of the small subunit of calcium-activated neutral protease (CANP) is essential for its activation by phosphatidylinositol. *J. Biochem. (Tokyo).* 1986 ; 99(4) :1281-1284.

Imajoh S., Aoki K., Ohno S., Emori Y., Kawasaki H., Sugihara H. and Suzuki K. (56)

Molecular cloning of the cDNA for the large subunit of the high-Ca²⁺-requiring form of human Ca²⁺-activated neutral protease. *Biochemistry.* 1988 ; 27 :8122-8132.

Inomata M., Saito Y., Kon K. and Kawashima S. (128)

Binding sites for calcium-activated neutral protease on erythrocyte membranes are not membrane phospholipides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990 ; 171 :625-632.

Inomata M., Hayashi M., Ohno-Iwashita Y., Tsubuki S., Saido T.C. and Kawashima S. (215)

Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996 ; 328(1) :129-134.

- Ishiura S., Murofushi H., Suzuki K. and Imahori K. (175)**
Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *J. Biochem. (Tokyo)*. 1978 ; 84(1) :225-230.
- Jeong S.Y., Sorimachi H., Lee H.J., Ishiura S. and Suzuki K. (54)**
Molecular cloning and characterization of cDNAs for the mu-type large subunit and the small subunit of chicken calpain. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 1997 ; 118(3) :539-547.
- Joffroy S., Dourdin N., Delage J.P., Cottin P., Koenig J. and Brustis J.J. (466)**
M-calpain levels increase during fusion of myoblasts in the mutant muscular dysgenesis (mdg) mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 2000 ; 44 : 421-428.
- Kampfl A., Posmantur R., Nixon R., Grynspan F., Zhao X., Liu S.J., Newcomb J.K., Clifton G.L. and Hayes R.L. (225)**
mu-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J. Neurochem.* 1996 ; 67(4) :1575-1583.
- Kaneda Y., Kinoshita K., Sato M., Saeki Y., Yamada R., Wataya-Kaneda M. and Tanaka K. (409)**
The induction of apoptosis in HeLa cells by the loss of LBP-p40. *Cell. Death Differ.* 1998 ; 5(1) :20-28.
- Kapprell H.P. and Goll D.E. (145) (159)**
Effect of Ca²⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.* 1989 ; 264(30) :17888-17896.
- Karlsson J.O., Blennow K., Janson I., Blomgren K., Karlsson I., Regland B., Wallin A. and Gottfries C.G. (224)**
Increased proteolytic activity in lymphocytes from patients with early onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* 1995 ; 16(6) :901-906.
- Kato M., Nonaka T., Maki M., Kikuchi H. and Imajoh-Ohmi S. (280)**
Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells. *J. Biochem. (Tokyo)*. 2000 ; 127(2) : 297-305.
- Kawasaki H., Emori Y., Imajoh-Ohmi S., Minami Y. and Suzuki K. (152)**
Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. *J. Biochem.* 1989 ; 106 :274-281.
- Kawasaki H. and Kawashima S. (68)**
Regulation of calpain-calpastatin system by membranes. *Mol. Membr. Biol.* 1996 ; 13 :217-324.
- Kawashima S., Hayashi S., Saito Y., Kasai Y. and Imahori K. (187)**
Tissue distribution of calcium-activated neutral proteinases in rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1988 ; 965 :130-135.
- Kawashima S., Akanuma H. and Asaoka K. (61)**
Comparison of calpains from rabbit, monkey, human and rat. *Biol. Chem.* 1998 ; 379(2) :201-204.
- Kenney D.M., Reid R., Parent D.W., Rosen F.S. and Remold-O'Donnell E. (235)**
Evidence implicating calpain (Ca²⁺-dependent neutral protease) in the destructive thrombocytopenia of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Br. J. Haematol.* 1994 ; 87(4) :773-781.
- Kinbara K., Ishiura S., Tomioka S., Sorimachi H., Jeong S.Y., Amano S., Kawasaki H., Kolmerer B., Kimura S., Labeit S. and Suzuki K. (143)**
Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem. J.* 1998 ; 335 (Pt 3) :589-596.
- Klee C.B., Croutch T.H. and Richman P.G. (40)**
Calmodulin. *Annu. Rev. Biochem.* 1990 ; 49 :489-515.

Knudsen K.A. and Horwitz A.F. (290)

Tandem events in myoblast fusion. *Dev. Biol.* 1977 ; 58(2) :328-338.

Knudsen K.A., Myers L. and McElwee S.A. (292)

A role for the Ca²⁺-dependent adhesion molecule N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Exp. Cell Res.* 1990 ; 188 :175-184.

Koohmaraie M. (416)

Quantification of Ca²⁺-dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography. *J. Anim.Sci.* 1990 ; 68(3) : 659-665.

Koster A.J., Walz J., Lupas A. and Baumeister W. (24)

Structural features of archaeobacterial and eukaryotic proteasomes. *Mol. Biol. Rep.* 1995 ; 21(1) :11-20.

Kretsinger R.H. and Kockolds C.E. (38)

Carp muscle calcium-binding protein. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* 1973 ; 248 :3313-3326.

Kuboki M., Ishii H. and Kazama M. (129)

Characterization of calpain I-binding proteins in human erythrocyte plasma membrane. *J. Biochem.* 1990 ; 107 :776-780.

Kuida K., Lippke J.A., Ku G., Harding M.W., Livingston D.J., Su M.S. and Flavell R.A. (241)

Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science.* 1995 ;267(5206):2000-2003.

Kumamoto T., Kleese W.C., Cong J.Y., Goll D.E., Pierce P.R. and Allen R.E. (186) (192) (450)

Localization of the Ca²⁺-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. *Anat. Rec.* 1992 ; 232(1) :60-77.

Kwak K.B., Chung S.S., Kim O.M., Kang M.S., Ha D.B. and Chung C.H. (339)

Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1993 ; 1175(3) :243-249.

Laemmli U.K. (373)

Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 ; 385 : 737-740.

Lane R.D., Allan D.M. and Mellgren R.L. (191) (206)

A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells. *Exp. Cell Res.* 1992 ; 203(1) :5-16.

Larson P.F., Jenkison M. and Hudgson P. (425)

The morphological development of chick embryo skeletal muscle grown in tissue culture as studied by electron microscopy. *Journal of the Neurological Sciences.* 1970 ; 10 : 385-405.

Lassar A.B., Davis R.L., Wright W.E., Kadesch T., Murre C., Voronova A., Baltimore D. and Weintraub H. (328)

Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell.* 1991 ; 66 :305-315.

Lassar A.B., Skapek S.X. and Novitch B. (283)

Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994 ; 6(6) :788-794.

Laurent A., Pinset C., Aurade F., Vidaud M. and Montarras D. (472)

Expression of myotonic dystrophy protein kinase gene during *in vivo* and *in vitro* mouse myogenesis. *Cell. Mol. Biol.* 1997 ; **43** : 881-888.

Lawson M.A. and Purslow P.P. (456)

Differentiation in serum-free media : effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues. Organs.* 2000 ; **167** : 103-137.

Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G. and Earnshaw W.C. (258)

Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994 ; **371(6495)**:346-347.

Lee W.J., Hatanaka M. and Maki M. (149) (370)

Multiple forms of rat calpastatin cDNA in the coding region of functionally unknown amino-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992 ; **1129(2)** :251-253.

Lee W.J., Ma H., Takano E., Yang H.Q., Hatanaka M. and Maki M. (157)

Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. *J. Biol. Chem.* 1992 ; **267** :8437-8442.

Lemercier C., To R.Q., Carrasco R.A. and Konieczny S.F. (333)

The basic helix-loop-helix transcription factor Mist1 functions as a transcriptional repressor of myoD. *E.M.B.O. J.* 1998 ; **17(5)** :1412-1422.

Li P., Allen H., Banerjee S., Franklin S., Herzog L., Johnston C., McDowell J., Paskind M., Rodman L. and Salfeld J. (242)

Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.* 1995 ;**80(3)**:401-411.

Lin G.D., Chattopadhyay D., Maki M., Wang K.K., Carson M., Jin L., Yuen P.W., Takano E., Hatanaka M., De Luca L.J. and Narayana L.V. (81)

Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.* 1997 ; **4 (7)** :539-547.

Lindon C., Montarras D. and Pinset C. (476)

Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor Myf5 in proliferating myoblasts. *J. Cell. Biol.* 1998 ; **140** : 111-118.

Linkhart T.A., Clegg C.H. and Hauschika S.D. (288)

Myogenic differentiation in permanent clonal mouse myoblast cell lines: regulation by macromolecular growth factors in the culture medium. *Dev. Biol.* 1981 ; **86(1)** :19-30.

Liu W. and Linn S. (276)

Proteolysis of the human DNA polymerase varepsilon catalytic subunit by caspase-3 and calpain specifically during apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2000 ; **28(21)** : 4180-4188.

Ludolph D.C. and Konieczny S.F. (334)

Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *F.A.S.E.B. J.* 1995 ; **9(15)** : 1595-1604.

Lynch G. and Baudry M. (207)

The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science.* 1984 ; **224(4653)** :1057-1063.

Lynch G. (208)

Memory and the brain: unexpected chemistries and a new pharmacology. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1998 ; **70(1-2)** :82-100.

Maki M., Takano E., Osawa T., Ooi T., Murachi T. and Hatanaka M. (151) (161)

Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1988 ; 263 :10254-10261.

Maki M., Hatanaka M., Takano E. and Murachi T. (147)

Structure-function relationship of the calpastatins. Intracellular calcium-dependent proteolysis. *CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida.* 1990 : 32-51.

Martin D.A., Siegel R.M., Zheng L. and Lenardo M.J. (248)

Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273(8):4345-4349.

Maruyama K., Usami M., Kametani F., Tomita T., Iwatsubo T., Saido T.C., Mori H. and Ishiura S. (223)

Molecular interactions between presenilin and calpain: inhibition of m-calpain protease activity by presenilin-1, 2 and cleavage of presenilin-1 by m-, mu-calpain. *Int. J. Mol. Med.* 2000 ; 5(3) :269-273.

Matena K., Boehm T. and Dear N. (45)

Genomic organization of mouse Capn5 and Capn6 genes confirms that they are a distinct calpain subfamily. *Genomics.* 1998 ; 48(1) :117-120.

McConnell B.B., Gregory F.J., Stott F.J., Hara E. and Peters G. (411)

Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol. Cell. Biol.* 1999 ; 19(3) : 1981-1989.

McGinnis K.M., Gnegy M.E., Park Y.H., Mukerjee N. and Wang K.K. (275)

Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 ; 263(1) : 94-99.

McNally E.M., de Sa Moreira E., Duggan D.J., Bonnemann C.G., Lisanti M.P., Lidov H.G., Vainzof M., Passos-Bueno M.R., Hoffman E.P., Zatz M. and Kunkel L.M. (442)

Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1998 ; 7(5) :871-877.

Mege R.M., Goudou D., Diaz C., Nicolet M., Garcia L., Geraud G. and Rieger F. (291)

N-cadherin and N-CAM in myoblast fusion: compared localisation and effect of blockade by peptides and antibodies. *J. Cell. Sci.* 1992 ; 103 (Pt 4) :897-906.

Mege R.M., Goudou D., Giaume C., Nicolet M. and Rieger F. (296)

Is intracellular communication via gap junction required for myoblast fusion? *Cell. Adhes. Commun.* 1994 ; 2 :329-343.

Mellgren R.L. (180)

Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *F.E.B.S. Lett.* 1980 ; 109(1) :129-133.

Mellgren R.L. (156)

On the mechanism of binding of calpastatin, the protein inhibitor of calpains, to biologic membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988 ; 150(1) :170-176.

Mellgren R.L. (107)

Proteolysis of nuclear proteins by mu-calpain and m-calpain. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266(21) :13920-13924.

Melloni E. and Pontremoli S. (87)

The calpains. *Trends Neurosci.* 1989 ; 12(11) :438-444.

Melloni E., Michetti M., Salamino F. and Pontremoli S. (170)

Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for mu-isoforms. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273(21) :12827-12831.

Melloni E., Michetti M., Salamino F., Sparatore B. and Pontremoli S. (171)

Mecanism of action of a new component of the Ca^{2+} -dependent proteolytic system in rat brain : the calpain activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 ; 249 :583-588.

Melloni E., Averna M., Salamino F., Sparatore B., Minafra R. and Pontremoli S. (173)

Acyl-CoA-binding protein is a potent m-calpain activator. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275(1) :82-86.

Minami Y., Emori Y., Imajoh-Ohmi S., Kawasaki H. and Suzuki K. (74)

Carboxyl-terminal truncation and site-directed mutagenesis of the EF hand structure-domain of the small subunit of rabbit calcium-dependent protease. *J. Biochem. (Tokyo)*. 1988 ; 104(6) :927-933.

Minetti C., Sotgia F., Bruno C., Scartezzini P., Broda P., Bado M., Masetti E., Mazzocco M., Egeo A., Donati M.A., Volonte D., Galbiati F., Cordone G., Bricarelli F.D., Lisanti M.P. and Zara F. (441)

Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1998 ; 18(4) : 365-368.

Mizuarai S., Kamihira M., Nishijima K.I. and Iijima S. (482)

Integrase-mediated non viral gene transfection with enhanced integration efficiency. *J. Biosci. Bioengi.* 1999 ; 88 : 461-467.

Molinari M., Anagli J. and Carafoli E. (127) (136)

Ca^{2+} -activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80 kDa form. *J. Biol. Chem.* 1994 ; 269 :27992-27995.

Molinari M., Anagli J. and Carafoli E. (93)

PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1995 ; 270 :2032-2035.

Molinari M. and Carafoli E. (71)

Calpain : a cytosolic proteinase active at the membranes ? *J. Membrane Biol.* 1997 ; 156 :1-8.

Molkentin J.D., Black B.L., Martin J.F. and Olson E.N. (319) (432)

Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH. *Cell.* 1995 ; 83 :1125-1136.

Montarras D., Chelly J., Bober E., Arnold H., Ott M.O., Gros F. and Pinset C. (305) (475)

Developmental patterns in the expression of Myf5, MyoD, myogenin, and MRF4 during myogenesis. *New Biol.* 1991 ; 3(6) :592-600.

Montarras D., Pinset C., Perez M.C., Ilan J. and Gros F. (327)

Muscle differentiation: insulin-like growth factors as positive modulators of myogenic regulatory genes? *C R Acad. Sci. III.* 1993 ; 316(9) :1025-1031.

Montarras D., Aurade F., Johnson T., Ilan J., Gros F. and Pinset C. (323) (326)

Autonomous differentiation in the mouse myogenic cell line, C2, involves a mutual positive control between insulin-like growth factor II and MyoD, operating as early as at the myoblast stage. *J. Cell. Sci.* 1996 ; 109 :551-560.

Moraczewski J., Piekarska E., Bonavaud S., Wosinska K., Chazaud B. and Barlovatz-Meimon G. (193) (195) (451)

Differential intracellular distribution and activities of mu- and m-calpains during the differentiation of human myogenic cells in culture. *C R Acad. Sci. III.* 1996 ; 319(8) :681-686.

Mori S., Kanaki H., Tanaka K., Morisaki N. and Saito Y. (28)

Ligand-activated platelet derived growth factor β receptor is degraded through proteasome dependent proteolytic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995 ; 217 (1) :224-229.

Mugita N., Honda Y., Nakamura H., Fujiwara T., Tanaka K., Omura S., Shimbara N., Ogawa M., Saya H. and Nakao M. (494)

The involvement of proteasome in myogenic differentiation of murine myocytes and human rhabdomyosarcoma cells. *Int. J. Mol. Med.* 1999 ; 3(2) : 127-137.

Murachi T., Tanaka K., Hatanaka M. and Murakami T. (47)

Intracellular calcium-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv. Enzyme Reg.* 1980 ; 19 :407-424.

Murachi T. (188)

Intracellular protease and its inhibitor protein : calpain and calpastatin. In : Chenng, W. (ed) "Calcium and cell function" Vol. 4 Academic press N.Y. 1983. p377-410.

Murachi T. (146)

Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem. Int.* 1989 ; 18 :263-294.

Murakami T., Hatanaka M. and Murachi T. (183)

The cytosol of human erythrocytes contains a highly Ca^{2+} -sensitive thiol protease (calpain I) and its specific inhibitor protein (calpastatin). *J. Biochem. (Tokyo)*. 1981 ; 90(6) :1809-1816.

Murre C., McCaw P.S., Vaessin H., Caudy M., Jan L.Y., Jan Y.N., Cabrera C.V., Buskin J.N., Hauschka S.D., Lassar A.B., Weintraub H. and Baltimore D. (304)

Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989 ; 58 :537-544.

Muzio M., Chinnaiyan A.M., Kischkel F.C., O'Rourke K., Shevchenko A., Ni J., Scaffidi C., Bretz J.D., Zhang M., Gentz R., Mann M., Krammer P.H., Peter M.E. and Dixit V.M. (251)

FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell.* 1996 ; 85(6):817-827.

Muzio M., Salvesen G.S. and Dixit V.M. (260)

FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272(5):2952-2956.

Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S. and Dixit V.M. (249)

An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273(5):2926-2930.

Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Esumi E., Li S., Nonaka I. and Nabeshima Y. (313) (491)

Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature.* 1993 ; 364(6437) :532-535.

Nakagawa T. and Yuan J. (272) (501)

Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell. Biol.* 2000 ; 150(4) : 887-894.

Neumar R.W., Hagle S.M., DeGracia D.J., Krause G.S. and White B.C. (230)

Brain mu-calpain autolysis during global cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 1996 ; 66(1) :421-424.

Nicholson D.W. and Thornberry N.A. (239) (254)

Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 1997 ;22(8):299-306.

Nishimura T. and Goll D.E. (160)

Binding of calpain fragments to calpastatin. *J. Biol. Chem.* 1991 ; 266(18) :11842-11850.

Nixon P.J., Komenda J., Barber J., Deak Z., Vass I. and Diner B.A. (91)

Deletion of PEST-like region of photosystem two modifies the Q_B-binding pocket but does not prevent rapid turnover of D₁. *J. Biol. Chem.* 1995 ; 270 :14919-14927.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. (1)

Enzyme Nomenclature. *Acad. Press. Orlando.* 1992.

Ohno S., Emori Y., Imajoh S., Kawasaki H., Kisaragi M. and Suzuki K. (52) (72)

Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature.* 1984 ; 312(5994) :566-570.

Oka N., Yamamoto M., Schwencke C., Kawabe J., Ebina T., Ohno S., Couet J., Lisanti M.P. and Ishikawa Y. (438)

Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272(52) :33416-33421.

Olson E.N. (285)

Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.* 1992 ; 154 :261-272.

Olson E.N., Perry M. and Schulz R.A. (318)

Regulation of muscle cell differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* 1995 ; 172 :2-14.

Olwin B.B., Arthur K., Hannon K., Hein P., McFall A., Riley B., Szebenyi G., Zhou Z., Zuber M.E., Rapraeger A., Fallon J.F. and Kudla A.J. (284)

Role of FGFs in skeletal muscle and limb development. *Mol. Reprod. Dev.* 1994 ; 39 :90-101.

Onizuka K., Kunimatsu M., Ozaki Y., Muramatsu K., Sasaki M. and Nishino H. (181)

Distribution of mu-calpain proenzyme in the brain and other neural tissues in the rat. *Brain Res.* 1995 ; 697(1-2) :179-186.

Ono Y., Sorimachi H. and Suzuki K. (69)

Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998 ; 245 :289-294.

Orlowski M., Cardozo C. and Michaud C. (19)

Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry.* 1993 ; 32 :1563-1572.

Pang J.T., Lloyd S.E., Wooding C., Farren B., Pottinger B., Harding B., Leigh S.E., Pook M.A., Benham F.J., Gillett G.T., Taggart R.T. and Thakker R.V. (44)

Genetic mapping studies of 40 loci and 23 cosmids in chromosome 11p13-11q13, and exclusion of mu-calpain as the multiple endocrine neoplasia type 1 gene. *Hum. Genet.* 1996 ; 97(6) :732-741.

Pariat M., Carillo S., Molinari M., Salvat C., Debussche L., Bracco L., Milner J. and Piechaczyk M. (204) (210) (429)

Proteolysis by calpains : a possible contribution to degradation of p53. *Mol. Cell. Biol.* 1997 ; 17 :2806-2815.

Pariat M., Salvat C., Bebien M., Brockly F., Altieri E., Carillo S., Jariel-Encontre I. and Piechaczyk M. (487)

The sensibility of c-jun and c-fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers. *Biochem. J.* 2000 ; 345 : 129-138.

Peters J.M., Cejka Z., Harris J.R., Kleinschmidt J.A. and Baumeister W. (22)

Structural features of the 26 S proteasome complex. *J. Mol. Biol.* 1993 ; 234(4) :932-937.

Peters J.M., Franke W.W. and Kleinschmidt J.A. (20) (26)

Distinct 19S and 20S subcomplexes of the 26S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 1994 ; 269 :7709-7718.

Pieper F.R., Slobbe R.L., Ramaekers F.C., Cuyper H.T. and Bloemendal H. (398) (478)

Upstream regions of the hamster desmin and vimentin genes regulate expression during in vitro myogenesis. *E.M.B.O. J.* 1987 ; 6(12) : 3611-3618.

Pike B.R., Zhao X., Newcomb J.K., Wang K.K., Posmantur R.M. and Hayes R.L. (274)

Temporal relationships between de novo protein synthesis, calpain and caspase 3-like protease activation, and DNA fragmentation during apoptosis in septo-hippocampal cultures. *J. Neurosci. Res.* 1998 ; 52(5) : 505-520.

Pinney D.F., Pearson-White S.H., Konieczny S.F., Latham K.E. and Emerson C.P. (391)

Myogenic lineage determination and differentiation : evidence for regulatory gene pathway. *Cell.* 1988 ; 53 : 781-793.

Pinset C. and Whalen R.G. (320)

Induction of myogenic differentiation in serum-free medium does not require DNA synthesis. *Dev. Biol.* 1985 ; 108(2) :284-289.

Poirier C., Poussard S., Faust D.M., Imaizumi-Scherrer T., Weiss M.C., Ducastaing A., Montarras D., Pinset C. and Guenet J.L. (367)

Mapping, cloning, cDNA sequence and expression of the gene encoding the mouse micromolar calpain large subunit (Capn1). *Mamm. Genome.* 1998 ; 9 : 388-389.

Pontremoli S., Melloni E., Michetti M., Salamino F., Sparatore B. and Horecker B.L. (168)

An endogenous activator of the Ca²⁺-dependent proteinase of human neutrophils that increases its affinity for Ca²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1988 ; 85(6) :1740-1743.

Pontremoli S., Melloni E., Salamino F., Patrone M., Michetti M. and Horecker B.L. (197)

Activation of neutrophil calpain following its translocation to the plasma membrane induced by phorbol ester or fMet-Leu-Phe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989 ; 160(2) :737-743.

Pontremoli S., Viotti P.L., Michetti M., Sparatore B., Salamino F. and Melloni E. (172)

Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1990 ; 171 :569-574.

Pontremoli S., Viotti P.L., Michetti M., Salamino F., Sparatore B. and Melloni E. (163)

Modulation of inhibitory efficiency of rat skeletal muscle calpastatin by phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992 ; 187(2) :751-759.

Postigo A.A. and Dean D.C. (332)

ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *E.M.B.O. J.* 1997 ; 16(13) :3935-3943.

Pouliot Y., Holland P.C. and Blaschuk O.W. (293)

Developmental regulation of a cadherin during the differentiation of skeletal myoblasts. *Dev. Biol.* 1990 ; 141(2) :292-298.

Poussard S., Cottin P., Brustis J.J., Talmat S., Elamrani N. and Ducastaing A. (340) (406) (435) (447)

Quantitative measurement of calpain I and II mRNAs in differentiating rat muscle cells using a competitive polymerase chain reaction method. *Biochimie.* 1993 ; 75(10) :885-890.

Poussard S., Duvert M., Balcerzak D., Ramassamy S., Brustis J.J., Cottin P. and Ducastaing A. (236) (381) (470)

Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. *Cell Growth Diff.* 1996 ; 7 :1461-1469.

Powell-Braxton L., Hollingshead P., Warburton C, Dowd M., Pitts-Meek S., Dalton D., Gillett N. and Stewart T.A. (325)

IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev.* 1993 ; 7(12B) :2609-2617.

Prevostel C., Alice V., Joubert D. and Parker P.J. (444) (499)

Protein kinase C(alpha) actively downregulates through caveolae-dependent traffic to an endosomal compartment. *J. Cell. Sci.* 2000 ; 113 (Pt 14) : 2575-2584.

Quinn L.S., Steinmetz B., Maas A., Ong L. and Kaleko M. (321)

Type-1 insulin-like growth factor receptor overexpression produces dual effects on myoblast proliferation and differentiation. *J. Cell. Physiol.* 1994 ; 159(3) :387-398.

Rami A., Agarwal R., Botez G. and Winckler J. (212)

mu-Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain Res.* 2000 ; 866(1-2) :299-312.

Rawls A., Valdez M.R., Zhang W., Richardson J., Klein W.H. and Olson E.N. (316) (395) (474)

Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development.* 1998 ; 125(13) :2349-2358.

Rhodes S.J. and Konieczny S.F. (302)

Identification of MRF4 : a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 1989 ; 3 :2050-2061.

Richard I., Broux O., Allamand V., Fougerousse F., Chiannikulchai N., Bourg N., Brenguier L., Devaud C., Pasturaud P., Roudaut C., Hillaire D., Passos-Bueno M.R., Zatz M., Tischfield J.A., Fardeau M., Jackson C.E., Cohen D. and Beckmann J.S. (237)

Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell.* 1995 ; 81 :27-40.

Richard I. and Beckman J.S. (369)

Molecular cloning of mouse canp 3, the gene associated with limb-girdle muscular dystrophy 2A in human. *Mamm. Genome.* 1996 ; 7 : 377-379.

Richard I., Roudaut C., Saenz A., Pogue R., Grimbergen J.E., Anderson L.V., Beley C., Cobo A.M., De Diego C., Eymard B., Gallano P., Ginjaar H.B., Lasa A., Pollitt C., Topaloglu H., Urtizbera J.A., De Visser M., Van Der Kooi A., Bushby K., Bakker E., Lopez De Munain A., Fardeau M. and Beckmann J.S. (238)

Calpainopathy – A survey of mutations and polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 1999 ; 64 : 1524-1540.

Richter-Ruoff B. and Wolff D.H. (27)

Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the protease on mitotic cyclins in yeast. *F.E.B.S. Lett.* 1993 ; 336 (1) :34-36.

Rivett A.J. (15) (17)

Proteasomes : multiple proteinase complexes. *Biochem. J.* 1993 ; 291 :1-10.

Roberts M. and Dickson G. (496)

The future of Duchenne muscular dystrophy gene therapy: shrinking the dystrophin gene. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2002 ; 4(4) : 343-348.

Rock M.T., Dix A.R., Brooks W.H. and Roszman T.L. (216)

beta1 integrin-mediated T cell adhesion and cell spreading are regulated by calpain. *Exp. Cell. Res.* 2000 ; 261(1) :260-270.

Rogers S., Wells R. and Rechsteiner M. (88)

Amino acids sequences common to rapidly degraded proteins : the PEST hypothesis. *Science.* 1986 ; 234 :364-368.

Rosen G.D., Sanes J.R., LaChance R., Cunningham J.M., Roman J. and Dean D.C. (294)

Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell.* 1992 ; 69(7) :1107-1119.

Rudnicki M.A., Braun T., Hinuma S. and Jaenisch R. (311) (396)

Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell.* 1992 ; 71(3) :383-390.

Sabath D.E., Broome H.E. and Prystowsky M.B. (371)

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene.* 1990 ; 91 : 185-191.

Saido T.C., Shibata M., Takenawa T., Murofushi H. and Suzuki K. (125)

Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J. Biol. Chem.* 1992 ; 267 :24585-24590.

Saido T.C., Nagao S., Shiramine M., Tsukaguchi M., Yoshizawa T., Sorimachi H., Ito H., Tsuchiya T., Kawashima S. and Suzuki K. (118)

Distinct kinetics of subunit autolysis in mammalian m-calpain activation. *F.E.B.S. Lett.* 1994 ; 346(2-3) :263-267.

Sakai K., Akanuma H., Imahori K. and Kawashima S. (95)

A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis. *J. Biochem. (Tokyo).* 1987 ; 101(4) :911-918.

Sakihama T., Kakidani H., Zenita K., Yumota N., Kikuchi T., Sasaki T., Kannagi R., Nakanishi S., Ohmori K., Takio K., Titani K and Murachi T. (58)

A putative Ca²⁺-binding protein : structure of the light subunit of porcine calpain elucidated by molecular cloning and protein sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985 ; 82 :6075-6079.

Sakon M., Kambayashi J., Ohno H. and Kosaki G. (184)

Two forms of Ca⁺⁺-activated neutral protease in platelets. *Thromb. Res.* 1981 ; 24(3) :207-214.

Salamino F., De Tullio R., Mengotti P., Viotti P.L., Melloni E. and Pontremoli S. (169)

Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane-associated natural activator protein. *Biochem. J.* 1993 ; 290 :191-197.

Salamino F., De Tullio R., Mengotti P., Melloni E. and Pontremoli S. (166)

Differential regulation of mu- and m-calpain in rat hearts perfused with Ca²⁺ and cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994 ; 202(3) :1197-1203.

Salamino F., De Tullio R., Michetti M., Mengotti P., Melloni E. and Pontremoli S. (164)

Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994 ; 199(3) :1326-1332.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (364) (372)

Molecular cloning : a laboratory manual. 1989. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.

- Sassoon D., Lyons G., Wright W.E., Lin V., Lassar A., Weintraub H. and Buckingham M.** (307)
Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*. 1989 ; 341(6240) :303-307.
- Sato N., Fujio Y., Yamada-Honda F., Funai H., Wada A., Kawashima S., Awata N. and Shibata N.** (102)
Elevated calcium level induces calcium-dependent proteolysis of A-CAM (N-cadherin) in heart analysis by detergent-treated model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995 ; 217(2) :649-653.
- Sato-Kusubata K., Yajima Y. and Kawashima S.** (104)
Persistent activation of G α through limited proteolysis by calpain. *Biochem. J.* 2000 ; 347 (Pt 3) : 733-740.
- Savart M., Verret C., Dutaud D., Touyarot K., Elamrani N. and Ducastaing A.** (214)
Isolation and identification of a μ -calpain-protein kinase C α complex in skeletal muscle. *F.E.B.S. Lett.* 1995 ; 359 :60-64.
- Scherer P.E., Lewis R.Y., Volonte D., Engelman J.A., Galbiati F., Couet J., Kohtz D.S., van Donselaar E., Peters P. and Lisanti M.P.** (479)
Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272(46) :29337-29346.
- Schoenwaelder S.M., Kulkarni S., Salem H.H., Imajoh-Ohmi S., Yamao-Harigaya W., Saido T.C. and Jackson S.P.** (117)
Distinct substrate specificities and functional roles for the 78- and 76-kDa forms of mu-calpain in human platelets. *J. Biol. Chem.* 1997 ; 272(40) :24876-24884.
- Schollmeyer J.E.** (336)
Role of Ca²⁺ and Ca²⁺-activated protease in myoblast fusion. *Exp. Cell. Res.* 1986 ; 162(2) :411-422.
- Schollmeyer J.E.** (337) (449)
Possible role of calpain I and calpain II in differentiating muscle. *Exp. Cell. Res.* 1986 ; 163(2) :413-422.
- Schumacher P.A., Eubanks J.H. and Fehlings M.G.** (226)
Increased calpain I-mediated proteolysis, and preferential loss of dephosphorylated NF200, following traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*. 1999 ; 91(2) :733-744.
- Servadio A. and Casari G.** (148)
Novel rat calpastatin mRNA variants. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993 ; 30(4) :721-725.
- Shcherbina A., Bretscher A., Kenney D.M. and Remold-O'Donnell E.** (498)
Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *F.E.B.S. Lett.* 1999 ; 443(1) :31-36.
- Shields D.C., Schaecher K.E., Goust J.M. and Banik N.L.** (234)
Calpain activity and expression are increased in splenic inflammatory cells associated with experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 1999 ; 99(1) :1-12.
- Shimokawa T., Kato M.K., Ezaki O. and Hashimoto S.** (473) (477)
Transcriptional regulation of muscle-specific genes during myoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1998 ; 246 : 287-292.
- Shockett P., Difilippantonio M., Hellman N. and Schatz DG.** (360) (361) (419)
A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1995 ; 92(14) : 6522-6526.

- Shumway S.D., Maki M. and Miyamoto S.** (90) (105) (389) (488)
The PEST domain of IkappaBalpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain. *J. Biol. Chem.* 1999 ; 274(43) :30874-30881.
- Song K.S., Scherer P.E., Tang Z., Okamoto T., Li S., Chafel M., Chu C., Kohtz D.S. and Lisanti M.P.** (402) (437) (480)
Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 1996 ; 271(25) :15160-15165.
- Sorimachi H., Imajoh-Ohmi S., Emori Y., Kawasaki H., Ohno S., Minami Y. and Suzuki K.** (62) (63) (66) (85) (199)
Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and μ -types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 1989 ; 264 :20106-20111.
- Sorimachi H. and Suzuki K.** (84)
Sequence comparison among muscle-specific calpain, p94, and calpain subunits. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992 ; 1160(1) :55-62.
- Sorimachi H., Toyama-Sorimachi N., Saido T.C., Kawasaki H., Sugita H., Miyasaka M., Arahata K., Ishiura S. and Suzuki K.** (203)
Muscle specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J. Biol. Chem.* 1993 ; 268 :10593-10605.
- Sorimachi H., Saido T.C. and Suzuki K.** (41) (64)
New area of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains. *F.E.B.S. Lett.* 1994 ; 343 : 1-5.
- Sorimachi H., Tsukahara T., Okada-Ban N., Sugitah H., Ishiura S. and Suzuki K.** (53)
Identification of a third ubiquitous calpain species chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochem. Biophys. Acta.* 1995 ; 1261 :381-393.
- Sorimachi H., Amano S., Ishiura S. and Suzuki K.** (60)
Primary sequences of rat mu-calpain large and small subunits are, respectively, moderately and highly similar to those of human. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996 ; 1309(1-2) :37-41.
- Sorimachi H., Ishiura S. and Suzuki K.** (76) (86)
Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* 1997 ; 328 :721-732.
- Sorimachi Y., Harada K., Saido T.C., Ono T., Kawashima S. and Yoshida K.** (233)
Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J. Biochem. (Tokyo).* 1997 ; 122(4) :743-748.
- Squier M.K. and Cohen J.J.** (211)
Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* 1997 ; 158 :3690-3697.
- Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G. and Alnemri E.S.** (261)
Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996 ; 93(25):14486-14491.
- Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T. and Alnemri E.S.** (264)
Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell.* 1998 ; 1(7):949-957.
- Steinhilber U., Badock V., Bauer A., Behrens J., Wittman-Liebold B., Dorken B. and Bommert K.** (257)
Apoptosis-induced cleavage of beta-catenin by caspase-3 results in proteolytic fragments with reduced transactivation potential. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275(21):16345-16353.

Stennicke H.R. and Salvesen G.S. (240)

Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2000 ;1477(1-2):299-306.

Stewart C.E., James P.L., Fant M.E. and Rotwein P. (324)

Overexpression of insulin-like growth factor-II induces accelerated myoblast differentiation. *J. Cell. Physiol.* 1996 ; 169(1) :23-32.

Stockholm D., Barbaud C., Marchand S., Ammarguella F., Barritault D., Richard I., Beckmann J. and Martelly I. (342) (465) (471)

Studies on calpain expression during differentiation of rat satellite cells in primary cultures in the presence of heparin or a mimic compound. *Exp. Cell. Res.* 1999 ; 252(2) :392-400.

Stott F.J., Bates S., James M.C., McConnell B.B., Starborg M., Brookes S., Palmero I., Ryan K., Hara E., Vousden K.H. and Peters G. (410)

The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *E.M.B.O. J.* 1998 ; 17(17) :5001-5014.

Strasser A., O'Connor L. and Dixit V.M. (244)

Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2000 ; 69:217-245.

Suzuki K., Ishiura S., Tsuji S., Katamoto T., Sugita H. and Imahori K. (179)

Calcium activated neutral protease from human skeletal muscle. *F.E.B.S. Lett.* 1979 ; 104(2) :355-358.

Suzuki K., Ohno S., Imajoh S., Emori Y. and Kawasaki H. (189)

Identification and distribution of mRNA for calcium-activated neutral protease (CANP). *Biomed. Res.* 1985 ; 6 :323-327.

Suzuki K., Sorimachi H., Yoshizawa T., Kinbara K. and Ishiura S. (142)

Calpain : novel family members, activation and physiological function. *Biol. Chem.* 1995 ; 376 :523-529.

Suzuki K. and Sorimachi H. (135) (137)

A novel aspect of calpain activation. *F.E.B.S. Lett.* 1998 ; 433 :1-4.

Takahashi A., Hirata H., Yonehara S., Imai Y., Lee K.K., Moyer R.W., Turner P.C., Mesner P.W., Okazaki T., Sawai H., Kishi S., Yamamoto K., Okuma M. and Sasada M. (262)

Affinity labeling displays the stepwise activation of ICE-related proteases by Fas, staurosporine, and CrmA-sensitive caspase-8. *Oncogene.* 1997 ; 14(23):2741-2752.

Takahashi M., Altschmied L. and Hillen W. (421)

Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. Evidence for divalent metal ion requirement and energy transfer. *J. Mol. Biol.* 1986 ; 187(3) : 341-348.

Takai Y., Kishimoto A., Inoue M. and Nishizuka Y. (50)

Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* 1977 ; 252 :7603-7609.

Takano E., Ma H., Yang H.Q., Maki M. and Hatanaka M. (153)

Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *F.E.B.S. Lett.* 1995 ; 236 : 93-97.

Takano J., Kawamura T., Murase M., Hitomi K. and Maki M. (150)

Structure of mouse calpastatin isoforms : implications of species-common and species-specific alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 ; 260 :339-345.

Takeyama Y., Nakanishi H., Uratsuji Y., Kishimoto A. and Nishizuka Y. (167)

A calcium-protease activator associated with brain microsomal-insoluble elements. *F.E.B.S. Lett.* 1986 ; 194(1) :110-114.

Tang Z., Scherer P.E., Okamoto T., Song K., Chu C., Kohtz D.S., Nishimoto I., Lodish H.F. and Lisanti M.P. (401)

Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 1996 ; 271(4) : 2255-2261.

Temm-Grove C.J., Wert D., Thompson V.F., Allen R.E. and Goll D.E. (351) (385) (457) (469)

Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. *Exp. Cell. Res.* 1999 ; 247(1) :293-303.

Theopold U., Pinter M., Daffre S., Tryselius Y., Friedrich P., Nassel D.R. and Hultmark D. (42) (79)

Calp A, a drosophila calpain homolog specially expressed in a small set of nerve, midgut and blood cells. *Mol. Cell. Biol.* 1995 ; 15 :824-834.

Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meinel E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J.L., Schroter M., Scaffidi C., Krammer P.H., Peter M.E. and Tschopp J. (270)

Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 1997 ; 386(6624):517-521.

Thompson C.B. (154)

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995 ; 267 :1456-1461.

Thompson V.F. and Goll D.E. (174)

Purification of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin from animal tissues. *Methods Mol. Biol.* 2000 ; 144 :3-16.

Thompson V.F., Lawson K. and Goll D.E. (132) (486)

Effect of mu-calpain on m-calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 ; 267(2) :495-499.

Thornberry N.A. and Lazebnik Y. (256)

Caspases: enemies within. *Science.* 1998 ; 281(5381):1312-1316.

Tidball J.G. and Spencer M.J. (229) (388) (453)

Calpains and muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2000 ; 32(1) :1-5.

Tin Chua B., Guo K. and Li P. (213)

Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem.* 2000 ; 275 :5131-5135.

Tomanek R.J. and Colling-Saltin A.S. (427)

Cytological differentiation of human fetal skeletal muscle. *Am. J. Anat.* 1977 ; 149 : 227-246.

Tompa P., Baki A., Schad E. and Friedrich P. (131)

The calpain cascade. Mu-calpain activates m-calpain. *J. Biol. Chem.* 1996 ; 271(52) :33161-33164.

Tompa P., Friedrich P. (120)

Kinetic analysis of human mu-calpain autolysis. *Methods Mol. Biol.* 2000 ; 144 :129-136.

Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. (374)

Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979 ; 76 : 4350-4354.

Twining S.S. (376)

Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 1984 ; 143(1) :30-34.

Ueda Y., Wang M.C., B.R., Huang J., Elce J., Tanaka K., Ichiara A. and Forsberg N.E. (33) (463)
Evidence for the participation of the proteasome and calpain in early phases of muscle cell differentiation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1998 ; 30 :679-694.

Ueyama H., Kumamoto T., Fujimoto S., Murakami T. and Tsuda T. (228) (387) (454)
Expression of three calpain isoform genes in human skeletal muscles. *J. Neurol. Sci.* 1998 ; 155(2) :163-169.

Vanderklish P.W., Krushel L.A., Holst B.H., Gally J.A., Crossin K.L. and Edelman G.M. (209)
Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000 ; 97(5) :2253-2258.

Venuti J.M., Morris J.H., Vivian J.L., Olson E.N. and Klein W.H. (314)
Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell. Biol.* 1995 ; 128(4) :563-576.

Verret C., Poussard S., Touyarot K., Donger C., Savart M., Cottin P. and Ducastaing A. (101)
Degradation of protein kinase M α by μ -calpain in a μ -calpain-protein kinase C α complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999 ; 1430 : 141-148.

Villa P.G., Henzel W.J., Sensenbrenner M., Henderson C.E. and Pettmann B. (98)
Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J. Cell. Sci.* 1998 ; 111 (Pt 6) : 713-722.

Wakelam M.J.O. (286)
The fusion of myoblasts. *Biochem. J.* 1985 ; 228 :1-12.

Walker N.P., Talanian R.V., Brady K.D., Dang L.C., Bump N.J., Ferez C.R., Franklin S., Ghayur T., Hackett M.C. and Hammill L.D. (246)
Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell.* 1994 ;78(2):343-352.

Walowitz J.L., Bradley M.E., Chen S. and Lee T. (430)
Proteolytic regulation of the zinc finger transcription factor YY1, a repressor of muscle-restricted gene expression. *J. Biol. Chem.* 1998 ; 273 : 6656-6661.

Walsh F.S. and Phillips E. (508)
Specific changes in cellular glycoproteins and surface proteins during myogenesis in clonal muscle cells. *Dev. Biol.* 1981 ; 81(2) :229-237.

Walsh K. and Perlman H. (335)
Cell cycle exit upon myogenic differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1997 ; 7(5) : 597-602.

Wang K.K. (277) (279) (281)
Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 2000 ; 23(1) : 20-26.

Wang S., Miura M., Jung Y.K., Zhu H., Li E. and Yuan J. (243)
Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell.* 1998 ;92(4):501-509.

Warren R.H. (426)
Interaction of the sarcoplasmic reticulum with Z-lines during myogenesis in amphibian skeletal muscle. *Anat. Rec.* 1973 ; 177 : 225-242.

Watt F. and Molloy P.L. (106) (390)
Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. *Nucleic Acids Res.* 1993 ; 21(22) :5092-5100.

Waxman L. and Krebs E.G. (177)

Identification of two protease inhibitors from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 1978 ; 253(17) :5888-5891.

Weintraub H. (431)

The MyoD family and myogenesis : redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 1993 ; 75 : 1241-1244.

Werner E.D., Brodsky J.L. and McCracken A.A. (30)

Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1996 ; 93(24) :13797-13801.

Wheelock M.J. (67) (403)

Evidence for two structurally different forms of skeletal muscle Ca^{2+} -activated protease. *J. Biol. Chem.* 1982 ; 257 :12471-12474.

Wilk S. and Orlowski M. (18)

Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J. Neurochem.* 1983 ; 40 : 842-849.

Wilson K.P., Black J.A., Thomson J.A., Kim E.E., Griffith J.P., Navia M.A., Murcko M.A., Chambers S.P., Aldape R.A. and Raybuck S.A. (247)

Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature.* 1994 ;370(6487):270-275.

Wilson R., Ainscough R., Anderson K., Baynes C., Berks M., Bonfield J., Connell M., Copsey T. and coll. (43)

2, 2 Mb of continuous nucleotide sequence from chromosome III of *C.elegans*. *Nature.* 1994 ; 368 :32-38.

Wolfe F.H., Sathé S.K., Goll D.E., Kleese W.C., Edmunds T. and Duperret S.M. (375)

Chicken skeletal muscle has three Ca^{2+} -dependent proteinases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989 ; 998(3) :236-250.

Wright W.E., Sassoon D.A. and Lin V.K. (301) (489)

Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD1. *Cell.* 1989 ; 56 :607-617.

Wyborski D.L. and Short J.M. (358) (408)

Analysis of inducers of the E.coli lac repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res.* 1991 ; 19(17) : 4647-4653.

Yaffe D. and Saxel O. (355) (378)

Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977 ; 270 : 725-727.

Yoshida K., Sorimachi Y., Fujiwara M. and Hironaka K. (232)

Calpain is implicated in rat myocardial injury after ischemia or reperfusion. *Jpn. Circ. J.* 1995 ; 59(1) :40-48.

Yoshimoto R., Hori M., Ozaki H. and Karaki H. (100)

Proteolysis of acidic calponin by mu-calpain. *J. Biochem. (Tokyo).* 2000 ; 128(6):1045-1049.

Yoshimura T., Kameyama K., Takagi T., Ikai A., Tokunaga F., Koide T., Tanahashi N., Tamura T., Cejka Z., Baumeister W. and coll. (23)

Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J. Struct. Biol.* 1993 ; 111(3) :200-211.

Yoshizawa T., Sorimachi H., Tomioka S., Ishiura S. and Suzuki K. (133) (404)

A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *F.E.B.S. Lett.* 1995 ; 358 :101-103.

Yoshizawa T., Sorimachi H., Tomioka S., Ishiura S. and Suzuki K. (134)

Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1995 ; 208 (1) : 376-383.

Yun K. and Wold B. (433) (493)

Skeletal muscle determination and differentiation : story of a core regulatory network and its context. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1996 ; 8 : 877-889.

Zhang W., Behringer R.R. and Olson E.N. (315)

Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev.* 1995 ; 9(11) :1388-1399.

Zhang W. and Mellgren R.L. (139)

Calpain subunits remain associated during catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996 ; 227 :890-896.

Zhang W., Lu Q., Xie Z.J. and Mellgren R. (205)

Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone : evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G₁ to S-phase transition. *Oncogene.* 1997 ; 14 : 255-263.

PUBLICATIONS
ET COMMUNICATIONS

Publications internationales

Dargelos E., Dedieu S., **Moyen C.**, Poussard S., Veschambre P., Brustis J.J., Cottin P.
Characterization of the calcium-dependent proteolytic system in a mouse muscle cell line
Molecular and Cellular Biochemistry. 2001, 231:147-154.

Dargelos E., **Moyen C.**, Dedieu S., Veschambre P., Poussard S., Vuillier-Devillers K., Brustis J.J., Cottin P.
Development of an inducible system to assess p94 (CAPN3) function in cultured muscle cells
Journal of Biotechnology. 2002, 271-279.

Moyen C., Veschambre P., Poussard S., Brustis J.J., Cottin P.
How to induce μ -calpain over expression in mouse myoblasts (C2C12).
Publication soumise: *Eur. J. Cell. Biol.*

Moyen C., Veschambre P., Poussard S., Brustis J.J., Cottin P.
Incidence of μ -calpain over expression in myoblasts on muscle cell differentiation.
Publication en préparation.

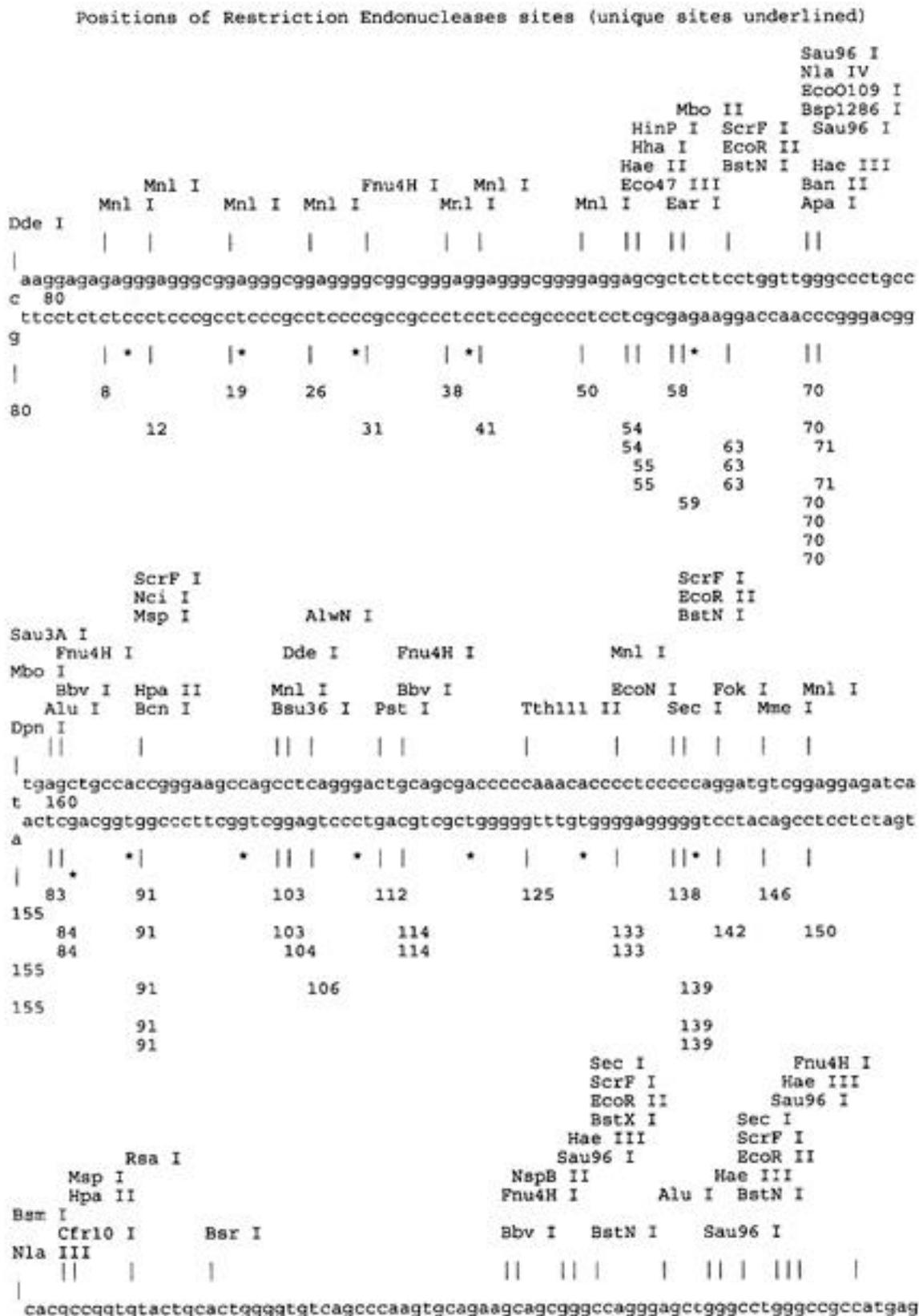
Communications

Dargelos E., **Moyen C.**, Yayer E., Poussard S., Brustis J.J., Veschambre P., Cottin P.
An original approach to determine the roles of calpains in myopathies. International congress
of myology. Mars 2000, Nice , France.

Dargelos E., **Moyen C.**, Poussard S., Cottin P.
Calpains et différenciation musculaire. Mise en place de lignées cellulaires modifiées pour
l'expression du système protéolytique neutre calcium-dépendant.
Colloque national du groupe thématique « Protéolyse Cellulaire ».
5-6 Avril 2000, Arcachon, France.

ANNEXES

CARTE DE RESTRICTION DE LA SOUS-UNITE CATALYTIQUE DE LA μ -CALPAINE HUMAINE




```

329          344          355    363
329          344          356
330          344          356
330          344          359
332          359
332          359
332          362
332          362
333          362
          363
          363
                                     HgiA I

Bsp1286 I
                                     Sec I
                                     ScrF I
                                     EcoR II
                                     BstN I
          Sec I          Alu I
          Dsa I          Fok I
Bsr I          |          |          |          |          |          |
|
|cgccccacggaactgctgtcaaacccccagttcattgtggatggagctaccgcacagacatctgccagggagcactgg
g 480
|gcaggggtgccttgacgacagtttgggggtcaagtaaacctacctcgatgggctgtctgtagacgggtccctcgtgacc
c
|          |          *          *          |          *          |          *          *          |          *
|          *          *          |          *          |          *          |          *          *          |          *
475          405          427          439          466
          405          445          466
          466
          466
          471
          471

          Hae III
          Gdi II
Hae III          Eae I          Mnl I          Mnl I          Nla IV          Gdi II
          Fnu4H I          Mnl I          Mnl I          Dra III
Eae I          Alu I          |||          |          |          |          |          |          ||
|
|ggactgctggctcttggcggccattgcctccctcactctcaacgacaccctcctgcacccagtggttccgcacggccag
a 560
|cctgacgaccgagaacccggtaacggaggagtgagagttgctgtgggaggacgtggctcaccaaggcgtgccggtc
t
|          *          |||*          |          *          *          |          *          |          *          ||
|          *          *          |          *          |          *          |          *          |          *          ||
553          560          497          507          529          536          544          553
          498          511
          498
          499
          SfaN I
          Msp I
          Hpa II
          Nae I          Mbo II          Alu I          Mae II
          Pvu II
BspM I          Cfr10 I          NspB II          Tth111 I          Fok I
          ||          |          |          ||          |          |
|
|gcttccagaatggctatgccggcatcttccatttccagctgtggcaatttggggagtggggtggacgtggctcgtggatga
c 640
|cgaaggctcttaccgatacggccgtagaaggtaaaggctgacaccgtaaacccctcaccacctgcaccagcacctact
g
|*          *          ||*          |          *          ||          *          *          |          *          |
|*          *          ||*          |          *          ||          *          *          |          *          |
634          578          596          623
          578          585          596          624
639          579          597
          579
          582
                                     HgiA I
                                     HinP I
                                     Hha I

```



```

| *      |      *      | *      | *      | *      ||  ||*
1198      1130      1146      1158      1176      1183
                                     1165
                                     1183
                                     1183
                                     1184
                                     1188
                                     1188
                                     1189
                                     1189
                                     1189
                                     1189
                                     1189
                                     ScrF I
                                     EcoR II
                                     BstN I
                                     Nla IV
HgiA I      Hga I      Mnl I      Fok I
                                     Sau96 I
Bsp1286 I      Aha II      Msp I      Ava II
                                     Hpa II
                                     Ban I      Fnu4H I
|      |      |      |
cacaccgacgcectcaagagccggaccatccgcaaatggaacaccacactctacgaaggcaccctggcggcgggggagc
a 1280
gtgtgggctgcgggagttctcggcctggtaggcgcttacctgtgggtgtgagatgcttcogtggaccgcgccccctcg
t
| *      | *      | *      | *      | *      | *      | *      | *
1276      1208      1222      1259      1267
1276      1208      1222      1259
                                     1263
                                     1263
                                     1263
                                     Msp I
                                     Hpa II
BstU I      Sau3A I
Sec I      Mbo I
ScrF I
Sac II      Dpn I
Nci I
NspB II      Fnu4H I      PflM I      Dde I      Alw I      BamA I
Bcn I
Daa I      Bbv I      Xcm I      Hph I      Mnl I      BstY I      Fok I      Fok I
||      |      |      |      |      ||      |      |      |
ccgccccgggctgccgaaactaccagccaccttctgggtgaacctcagttcaagatccggctggatgagacggatga
c 1360
ggcgcccccgcagcggctttgatgggtcgggtggaagaccacttggggagtcaagttctagggccgacctactctgcctact
g
||      |      *      | *      | *      || *      || *      | *      |
1281      1290      1304      1318      1325      1335      1345
1354
1281      1290      1308      1326      1336      1349
1360
1281      1336
1360
1281      1336
1360
1282      1336
                                     1339
                                     1339
                                     Alu I
Fnu4H I
HinP I      Ple I      Fnu4H I
Hha I      BstU I      Bbv I
Hae II      Sau96 I      Fnu4H I
Msp I      Ava II      Bbv I      HgiA I      BstU I
Hpa II      Nla IV      Hinf I      Pst I      Bsp1286 I      Fnu4H I
Bgl I
||      |      |      |      |      |      |
ccggacgactacggggaccgcgagtcaggctgcagcttcgtgctcgcccttatgcagaagcaccgtcgcgcgagcgcc

```

```

g 1440
ggcctgctgatgccccctggcgctcagtcgacgctcgaagcaagcagcgggaatacgtcttcgtggcagcggcgctcgogg
c
| | | * | | | * | | | | | | * * | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
1361 1374 1382 1390 1400 1428
1437
1361 1375 1389 1400 1430
1434 1375 1389
1434 1379 1392
1435 1382 1392
1435 1394
1437

BstU I Msp I Gdi II
Fnu4H I Mnl I Eag I
Hae III Sau96 I Eae I
Gdi II Nla IV Msp I
Eag I BsmA I PpuM I Hpa II Hpa II
Eae I Nla III Acc I EcoO109 I Alu I Hae III Rsa I
| | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | |

cttcggccgagacatggagactattggcttcgcggtctacgaggtccctccggagctggtggccagccggccgtacac
t 1520
gaagcccgcgctgtacctctgataaccgaagcgcagatgctccagggaggcctcgaccaccggctcgcccgcatgtg
a
| | | | * | | * * | | * | | | * | | | |
* | | | | | | | | | | | | | | | |
1444 1453 1471 1481 1489 1501 1510
1444 1457 1475 1482 1494 1502
1514 1482 1490 1507
1444 1483 1507
1445 1483 1508
1446 1483 1508
1448 1487 1509
1490 1509
1509

Hae III Dde I
Mae I HinP I
Hae I HinP I
Eae I Hha I
ScrF I Hha I
EcoR II Ava I Hha I
Mbo II BsmA I BstU I
Mae III BstN I Hga I BshH II EcoN I
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |

tgaagcgtgacttcttctggccaatgctctcgggcgcgctcagagcagttcatcaacctgcgagaggtcagcacccg
c 1600
acttcgcactgaagaaggaccgggttacgcagagcccgcgcgagtctcgtcaagtagttggacgctctccagtcgtgggc
g
| * | | | | * | | | * | * | | * | *
* | | | | | | | | | | | | | | | |
1527 1537 1547 1556 1578 1586
1533 1549 1557 1579
1537 1551 1558
1537 1556
1539 1556
1539 1558
1539 1561
1540

Sec I
ScrF I
Nci I
Msp I
Hpa II
Bcn I
Xma I
Sma I
Sec I
ScrF I Mnl I

```



```

| | | | | | | |
gcaggcttcaagctcaacaagaagctgtacgagctcatcatcaccgcctactcggagcccgacctggcggtcgactttg
a 2160
cgtccgaagttcgagttgttcttccgacatgctcgagtagtagtggggcgatgagcctcgggctggacgccagctgaaac
t
* | * | | * || * | * || * | | ||
*
2091 2103 2111 2121 2134 2143 2151
2107 2135 2143 2150
2111 2150
2111 2141 2150
2111 2143
2112 2150
Fok I
ScrF I Sau3A I
EcoR II Mbo I
BstN I BsmA I Dpn I
Pnu4H I Mae I BstY I
Bbv I Pnu4H I Nla III Bgl II
Mae III
| | | | | | | |
caatttcgtttgcctgggtgggctagagaccatgttccgattttcaaaactctggacacagatctggatggagtt
g 2240
gttaaagcaaacgacggaccacgccgatctctgggtacaaggctaaaaagttttgagacctgtgtctagacctacctcaa
c
* | | * | | * | * * * || |
|
2240 2172 2182 2194 2224
2172 2186 2224
2176 2189 2225
2176 2225
2176 2225
2230
Alu I Sau96 I
Pvu II Nla IV
NspB II Nla III Tth111 I Ava II
Mnl I
Mse I Pnu4H I Tth111 II Ple I HgfA I
Bsp1286 I Bbv I Nla III Mnl I Hinf I
| | | | | | | |
tgaccttgaacttgtttaagtgggtgcagctgaccatgtttgcctgagggcagggactcggtecccttgcctgctccc
c 2320
actggaaactgaacaaattcaccacagctcgactgggtacaaacgtactccgctccctgagccagggggaacggcacgaggg
g
* | * | | * | | * | | * | * * |
|
2319 2256 2266 2275 2286 2294 2312
2266 2277 2294 2312
2267 2283 2294
2267 2299
2268 2299
2299
Hae III Pnu4H I
Hae I Bbv I
ScrF I Alu I
EcoR II Pvu II Sty I
BstN I NspB II Sec I
| | | | | |
tcctcctcgtctgccaaagcctcgcctcctaccacaccacaccaggccaccccagctgcaagtgccttcttggagcag
a 2400
agggaggagcagacggttcggagcggaggatggtgtggtgtggtcgggtgggggtcgacgttcaocggaaggaacctcgtc
t
| | * | | * * | | * | | * | *
*
2323 2340 2362 2373 2389
2326 2345 2362 2373 2389
2362 2374
2364 2375
2365 2375

```



```

g
| | | | * ||| ||| * * * | * * | *
2721 2731 2765 2783
2794
2721 2732 2765
2795
2725 2733
2795
2795 2733
2795 2733
2798 2733
2798 2735
2736
2736
2736
2736
2736
2736
2736
2737
2737
2737
2737
2737
2737
2737
2737
Fnu4H I
Bbv I
Alu I
ScrF I
EcoR II
Fnu4H I AlwN I Mnl I
Mae I
Bbv I BstN I PflM I Hae III
Dra I
| | | | |
||
cctgctgccgaccaggagctgcccagcctgtggggcggteggccttccctccttcgctccctttttatattagtgatttt
a 2880
ggacgacggctgggtcctcgacgggtcggacaccocccagccggaagggaggaaagcggaggaaaaaatataatcactaaaa
t
| * || || * | * | * * *
|| *
2804 2812 2823 2840
2877
2804 2813 2847
2878
2812
2812
2817
2818
2818
Eco57 I
Mbo II
Ear I
Ple I Bar I Nla IV Mae I Sau96 I
Hinf I Rsa I Ban I Mnl I Mnl I EcoO109 I
| | | | | | | | |
aaggggactcttcagggacttggtgactgggtatgggggtgccagaggcactaggcttgggggtggggagggtcccgtgtt
c 2960
ttccctcgagaagtccttgaacacatgaccaatacccccacggtctccgtgatccgaacccccaccctccagggcacia
g
| | | * | | * | * | * | * |||*
2886 2904 2918 2925 2947
2886 2906 2918 2931 2948
2888 2948
2889 2949
2890 2949
2949
Sau96 I
Nla IV
Hae III
Nla IV

```

```

      Mnl I                EcoO109 I
      ||                  ||
catatagagggaacccccaaataataaaaaggccccacatctgtctgtg 3006
gtatatctccttgggggtttattattttccgggggttagacagacac
      | | *                | | *
      2967                2987
      2969                2988
                        2988
                        2988

```

Restriction Endonucleases site usage

Aat II	-	BspH I	-	EcoR V	-	Mme I	1
Rsr II	-	BspM I	4	Esp I	-	Mnl I	61
Acc I	2	BspM II	4	Fnu4H I	33	Mac I	2
Sac I	1	Bsr I	5	Fok I	16	Mse I	2
Afl II	-	BssH II	1	Fsp I	1	Msp I	20
Sac II	1	BstB I	-	Gdi II	4	Nae I	2
Afl III	-	BstE II	1	Gsu I	5	Nar I	-
Sal I	1	BstN I	27	Hae I	10	Nci I	13
Aha II	1	BstU I	6	Hae II	4	Nco I	1
Sau3A I	10	BstX I	3	Hae III	32	Nde I	1
Alu I	23	BstY I	4	Hga I	2	Nhe I	-
Sau96 I	29	Bsu36 I	1	HgiA I	7	Nla III	13
Alw I	5	Cfr10 I	4	HgiE II	-	Nla IV	30
Sca I	-	Cla I	-	Hha I	9	Not I	-
AlwN I	3	Dde I	9	Hinc II	1	Nru I	-
ScrF I	40	Dpn I	10	Hind III	-	Nsi I	-
Apa I	2	Dra I	1	Hinf I	6	Nsp7524 I	-
Sec I	29	Dra III	1	HinP I	9	NspB II	7
Apal I	1	Drd I	1	Hpa I	-	NspH I	-
SfaN I	7	Dsa I	3	Hpa II	20	Paer7 I	-
Ase I	-	Eae I	6	Hph I	7	PflM I	3
Sfi I	-	Eag I	2	Kpn I	1	Ple I	6
Asp718	1	Ear I	6	Mae I	6	Pml I	-
Sma I	3	Eco47 III	1	Mae II	3	PpuM I	5
Ava I	7	Eco57 I	4	Mae III	6	Pst I	5
SnaB I	-	EcoN I	3	Mbo I	10	Pvu I	-
Ava II	11	EcoO109 I	11	Mbo II	10	Pvu II	5
Spe I	-	EcoR I	-	Nlu I	-	Rsa I	7
Avr II	-	EcoR II	27				
Sph I	-						
BamH I	-						
Spl I	-						
Ban I	4						
Ssp I	-						
Ban II	7						
Stu I	2						
Bce I	-						
Sty I	4						
Bbv I	23						
Taq I	3						
Bbv II	-						
Tth111 I	3						
Bcl I	-						
Tth111 II	5						
Bcn I	13						
Xba I	1						
Hgl I	2						
Xca I	-						
Hgl II	2						
Xho I	-						
BsaA I	-						
Xcm I	2						
Bsm I	1						
Xma I	3						
BsmA I	5						
Xmn I	-						
Bsp1286 I	14						

Aha II	gr/cgyc	1	1(1207) 2	1208(1799) 1	
ApaI I	g/tgcac	1	1(673) 2	674(2333) 1	
Asp718	g/gtacc	1	1(331) 2	332(2675) 1	
Bsm I	gaatgc	1/-1	1(238) 2	239(2768) 1	
BssH II	g/cgcgc	1	1(1555) 1	1556(1451) 2	
BstE II	g/gtnacc	1	1(801) 2	802(2205) 1	
Bsu36 I	cc/tnagg	1	1(102) 2	103(2904) 1	
Dra I	ttt/aaa	1	1(2876) 1	2877(130) 2	
Dra III	cacnnn/gtg	1	1(535) 2	536(2471) 1	
Drd I	gacnnnn/nngtc	1	1(2140) 1	2141(866) 2	
Eco47 III	agc/gct	1	1(53) 2	54(2953) 1	
Fsp I	tgc/gca	1	1(821) 2	822(2185) 1	
HinC II	gty/rac	1	1(2149) 1	2150(857) 2	
Kpn I	ggtag/c	1	1(331) 2	332(2675) 1	
Mme I	tccrac	20/18	1(145) 2	146(2861) 1	
Nco I	c/catgg	1	1(2489) 1	2490(517) 2	
Nde I	ca/tatg	1	1(1097) 2	1098(1909) 1	
Sac I	gagct/c	1	1(2110) 1	2111(896) 2	
Sac II	ccgc/gg	1	1(1280) 2	1281(1726) 1	
Sal I	g/tcgac	1	1(2149) 1	2150(857) 2	
Xba I	t/ctaga	1	1(912) 2	913(2094) 1	
Acc I	gt/mkac	2	1(1474) 1	1475(675) 3	2150(
857) 2					
Apa I	gggcc/c	2	1(69) 3	70(2444) 1	2514(
493) 2					
Bgl I	gccnnnn/nggc	2	1(1436) 1	1437(1096) 2	2533(
474) 3					
Bgl II	a/gatct	2	1(1187) 1	1188(1036) 2	2224(
783) 3					
Eag I	c/ggccg	2	1(1443) 2	1444(65) 3	1509(
1498) 1					
Hga I	gacgc	5/10	1(1207) 2	1208(339) 3	1547(
1460) 1					
Msc I	tgg/cca	2	1(1538) 1	1539(528) 3	2067(
940) 2					
Mse I	t/taa	2	1(2255) 1	2256(622) 2	2878(
129) 3					
Nae I	gcc/ggc	2	1(577) 3	578(929) 2	1507(
1500) 1					
Stu I	agg/cct	2	1(318) 3	319(401) 2	720(
2287) 1					
Xcm I	ccannnnn/nnntgg	2	1(243) 3	244(1060) 2	1304(
1703) 1					
AlwN I	cagnnn/ctg	3	1(105) 4	106(233) 2	339(
2474) 1	2813(194) 3				
BstX I	ccannnn/ntgg	3	1(210) 3	211(2426) 1	2637(
63) 4	2700(307) 2				
Dsa I	c/crygg	3	1(404) 4	405(876) 2	1281(
1209) 1	2490(517) 3				
EcoN I	cctnn/nnnagg	3	1(132) 3	133(121) 4	254(
1325) 2	1579(1428) 1				
Mae II	a/cgt	3	1(399) 3	400(224) 4	624(
465) 2	1089(1918) 1				
PflM I	ccannnn/ntgg	3	1(337) 3	338(970) 2	1308(
1515) 1	2823(184) 4				
Sma I	ccc/ggg	3	1(1612) 1	1613(961) 2	2574(
162) 4	2736(271) 3				
Tag I	t/cga	3	1(1643) 1	1644(507) 3	2151(
532) 2	2683(324) 4				
Tth111 I	gacn/nngtc	3	1(622) 2	623(1671) 1	2294(
391) 3	2685(322) 4				
Xma I	c/ccggg	3	1(1612) 1	1613(961) 2	2574(
162) 4	2736(271) 3				
Ban I	g/gyrec	4	1(331) 4	332(927) 2	1259(
371) 3	1630(1288) 1				
BspM I	acctgc	4/8	2918(89) 5		
596) 3	1578(300) 5		1(638) 2	639(343) 4	982(
BspM II	t/ccgga	4	1878(1129) 1		
503) 3	1992(21) 5		1(1016) 1	1017(472) 4	1489(
BstY I	r/gatcy	4	2013(994) 2		
			1(1187) 1	1188(147) 5	1335(

387) 4	1722(502) 3			2224(783) 2			
Cfr10 I	r/ccggy	4		1(163) 5	164(414) 3	578(
929) 2	1507(1132) 1			2639(368) 4			
Eco57 I	ctgaag 16/14	4		1(1791) 1	1792(102) 5	1894(
720) 2	2614(276) 3			2890(117) 4			
Gdi II	ygcccg -5/-1	4		1(497) 3	498(55) 5	553(
891) 2	1444(65) 4			1509(1498) 1			
Hae II	rgcgc/y	4		1(53) 5	54(650) 2	704(
158) 4	862(572) 3			1434(1573) 1			
Sty I	c/cwgg	4		1(728) 2	729(1158) 1	1887(
502) 4	2389(101) 5			2490(517) 3			
Alw I	ggatc 4/5	5		1(1014) 2	1015(321) 4	1336(
387) 3	1723(134) 5			1857(76) 6	1933(1074) 1		
BsmA I	gtctc 1/5	5		1(1157) 1	1158(191) 4	1349(
108) 5	1457(92) 6			1549(640) 3	2189(818) 2		
Bar I	actgg 1/-1	5		1(176) 4	177(250) 3	427(
48) 6	475(359) 2			834(2072) 1	2906(101) 5		
Gsu I	ctggag 16/14	5		1(699) 2	700(166) 3	866(
38) 6	904(156) 4			1060(124) 5	1184(1823) 1		
PpuM I	rg/gwccy	5		1(299) 3	300(55) 5	355(
7) 6	362(1120) 2			1482(1466) 1	2948(59) 4		
Pst I	ctgca/g	5		1(111) 5	112(179) 4	291(
1099) 2	1390(1265) 1			2655(38) 6	2693(314) 3		
Pvu II	cag/ctg	5		1(272) 5	273(323) 4	596(
1203) 1	1799(468) 3			2267(106) 6	2373(634) 2		
Tth111 II	caarca 11/9	5		1(124) 6	125(586) 3	711(
268) 5	979(888) 1			1867(410) 4	2277(730) 2		
BstU I	cg/cg	6		1(1281) 2	1282(97) 3	1379(
51) 5	1430(18) 7			1448(23) 6	1471(86) 4	1557(
1450) 1				1(497) 4	498(55) 6	553(
Eae I	y/ggccr	6		1509(30) 7	1539(528) 3	2067(
891) 2	1444(65) 5			1(57) 6	58(248) 3	306(
940) 1				1760(30) 7	1790(1098) 2	2888(
Bar I	ctcttc 1/4	6		1(1381) 1	1382(522) 2	1904(
1384) 1	1690(70) 5			2294(212) 5	2506(380) 3	2886(
119) 4				1(664) 2	665(249) 6	914(
Hinf I	g/antc	6		1(1381) 1	1382(522) 2	1904(
171) 6	2075(219) 4			2294(212) 5	2506(380) 3	2886(
121) 7				1(664) 2	665(249) 6	914(
Mae I	c/tag	6		2186(492) 3	2678(253) 5	2931(
987) 1	1901(285) 4			1(348) 5	349(454) 4	803(
76) 7				968(559) 3	1527(713) 2	2240(
Mae III	/gtnac	6		1(1381) 1	1382(522) 2	1904(
34) 7	837(131) 6			2294(212) 5	2506(380) 3	2886(
767) 1				1(1550) 1	1551(62) 6	1613(
Ple I	gagtc 4/5	6		1(1381) 1	1382(522) 2	1904(
171) 6	2075(219) 4			2563(11) 7	2574(151) 4	2725(
121) 7				1(69) 6	70(804) 1	874(
Ava I	c/yccrg	7					
884) 2	2497(66) 5						
11) 8	2736(271) 3						
Ban II	grgcy/c	7					

772) 2	1646(465) 4		2111(24) 7	2135(359) 5	2494(
20) 8	2514(493) 3				
HgiA I	gwgcw/c	7	1(470) 3	471(203) 6	674(
602) 2	1276(124) 8				
			1400(351) 5	1751(360) 4	2111(
201) 7	2312(695) 1				
Hph I	ggtga 8/7	7	1(945) 1	946(39) 7	985(
21) 8	1006(170) 5				
			1176(142) 6	1318(603) 3	1921(
200) 4	2121(886) 2				
NspB II	cmg/ckg	7	1(203) 6	204(69) 8	273(
323) 5	596(685) 1				
			1281(518) 3	1799(468) 4	2267(
106) 7	2373(634) 2				
Rsa I	gt/ac	7	1(169) 5	170(81) 8	251(
82) 7	333(481) 4				
			814(700) 2	1514(593) 3	2107(
797) 1	2904(103) 6				
SfaN I	gcatc 5/9	7	1(285) 5	286(102) 7	388(
194) 6	582(439) 3				
			1021(968) 1	1989(70) 8	2059(
529) 2	2588(419) 4				
Dde I	c/tnag	9	1(79) 8	80(24) 10	104(
668) 2	772(303) 4				
			1075(251) 5	1326(235) 6	1561(
123) 7	1684(72) 9				
Hha I	gcg/c	9	1756(874) 1	2630(377) 3	
118) 6	823(40) 9		1(54) 8	55(650) 2	705(
			863(572) 3	1435(121) 5	1556(
2) 10	1558(117) 7				
HinP I	g/cgc	9	1675(1090) 1	2765(242) 4	
118) 6	823(40) 9		1(54) 8	55(650) 2	705(
			863(572) 3	1435(121) 5	1556(
2) 10	1558(117) 7				
			1675(1090) 1	2765(242) 4	
Dpn I	ga/tc	10	1(154) 7	155(695) 2	850(
165) 6	1015(174) 5				
			1189(147) 8	1336(387) 3	1723(
99) 9	1822(36) 11				
			1858(76) 10	1934(291) 4	2225(
782) 1					
Hae I	wgg/ccw	10	1(318) 5	319(401) 2	720(
204) 8	924(73) 10				
			997(542) 1	1539(189) 9	1728(
339) 4	2067(297) 6				
			2364(256) 7	2620(26) 11	2646(
361) 3					
Mbo I	/gatc	10	1(154) 7	155(695) 2	850(
165) 6	1015(174) 5				
			1189(147) 8	1336(387) 3	1723(
99) 9	1822(36) 11				
			1858(76) 10	1934(291) 4	2225(
782) 1					
Mbo II	gaaga 8/7	10	1(58) 9	59(248) 4	307(
278) 3	585(948) 1				
			1533(147) 6	1680(10) 11	1690(
70) 8	1760(31) 10				
			1791(219) 5	2010(879) 2	2889(
118) 7					
Sau3A I	/gatc	10	1(154) 7	155(695) 2	850(
165) 6	1015(174) 5				
			1189(147) 8	1336(387) 3	1723(
99) 9	1822(36) 11				
			1858(76) 10	1934(291) 4	2225(
782) 1					
Ava II	g/gwcc	11	1(300) 5	301(55) 10	356(
7) 12	363(730) 1				
			1093(15) 11	1108(116) 7	1224(
151) 6	1375(108) 8				
			1483(401) 4	1884(415) 3	2299(
650) 2	2949(58) 9				

Eco0109 I	rg/gnccy	11	1(69) 8	70(230) 5	300(
55) 9	355(7)12		362(388) 3	750(732) 1	1482(
303) 4	1785(729) 2		2514(218) 6	2732(216) 7	2948(
39)10	2987(20)11				
Bcn I	ccs/gg	13	1(90)10	91(238) 6	329(
643) 2	972(145) 7		1117(243) 5	1360(253) 4	1613(
1)12	1614(842) 1		2456(118) 9	2574(1)13	2575(
145) 8	2720(16)11		2736(1)14	2737(270) 3	
Nei I	cc/sgg	13	1(90)10	91(238) 6	329(
643) 2	972(145) 7		1117(243) 5	1360(253) 4	1613(
1)12	1614(842) 1		2456(118) 9	2574(1)13	2575(
145) 8	2720(16)11		2736(1)14	2737(270) 3	
Nla III	catg/	13	1(233) 5	234(685) 1	919(
37)12	956(209) 6		1165(288) 4	1453(363) 3	1816(
102)10	1918(12)13		1930(114) 9	2044(150) 8	2194(
81)11	2275(8)14		2283(208) 7	2491(516) 2	
Bsp1286 I	gdgch/c	14	1(69)12	70(401) 3	471(
203) 6	674(200) 7		874(402) 2	1276(124)10	1400(
231) 5	1631(15)15		1646(105)11	1751(360) 4	2111(
24)13	2135(177) 9		2312(182) 8	2494(20)14	2514(
493) 1					
Fok I	ggatg 9/13	16	1(141)10	142(297) 3	439(
195) 7	634(219) 6		853(167) 8	1020(126)11	1146(
82)14	1228(117)12		1345(9)17	1354(360) 2	1714(
261) 5	1975(15)16		1990(74)15	2064(166) 9	2230(
271) 4	2501(88)13		2589(418) 1		
Hpa II	c/cgg	20	1(90)13	91(74)15	165(
165) 6	330(249) 5		579(393) 2	972(46)17	1018(
99)12	1117(105)11		1222(117) 9	1339(22)18	1361(
129) 7	1490(18)20		1508(106)10	1614(379) 3	1993(
21)19	2014(442) 1		2456(119) 8	2575(65)16	2640(
81)14	2721(16)21		2737(270) 4		
Msp I	c/cgg	20	1(90)13	91(74)15	165(
165) 6	330(249) 5		579(393) 2	972(46)17	1018(
99)12	1117(105)11		1222(117) 9	1339(22)18	1361(
129) 7	1490(18)20		1508(106)10	1614(379) 3	1993(
21)19	2014(442) 1		2456(119) 8	2575(65)16	2640(
81)14	2721(16)21		2737(270) 4		
Alu I	ag/ct	23	1(82)17	83(134)12	217(
57)20	274(171) 5		445(115)13	560(37)22	597(
66)19	663(80)18		743(327) 1	1070(43)21	1113(
281) 2	1394(100)15				

153) 8	1953(138) 9	1494(216) 3	1710(90)16	1800(
156) 7	2268(106)14	2091(12)23	2103(9)24	2112(
137)10	2817(190) 4	2374(170) 6	2544(136)11	2680(
Bbv I	gcagc 8/12 23	1(83)17	84(30)19	114(
89)16	203(69)18	272(3)23	275(368) 2	643(
98)14	741(24)21	765(123)10	888(402) 1	1290(
99)13	1389(3)24	1392(280) 3	1672(126) 8	1798(
116)11	1914(126) 9	2040(132) 7	2172(94)15	2266(
109)12	2375(29)20	2404(138) 6	2542(262) 4	2804(
14)22	2818(189) 5			
BstN I	cc/wgg 27	1(62)18	63(76)15	139(
72)16	211(13)27	224(30)22	254(6)28	260(
84)13	344(15)26	359(107)11	466(534) 1	1000(
32)21	1032(27)23	1059(124) 8	1183(80)14	1263(
274) 2	1537(189) 5	1726(234) 3	1960(66)17	2026(
117) 9	2143(33)20	2176(186) 6	2362(149) 7	2511(
23)24	2534(110)10	2644(56)19	2700(95)12	2795(
17)25	2812(195) 4			
EcoR II	/ccwgg 27	1(62)18	63(76)15	139(
72)16	211(13)27	224(30)22	254(6)28	260(
84)13	344(15)26	359(107)11	466(534) 1	1000(
32)21	1032(27)23	1059(124) 8	1183(80)14	1263(
274) 2	1537(189) 5	1726(234) 3	1960(66)17	2026(
117) 9	2143(33)20	2176(186) 6	2362(149) 7	2511(
23)24	2534(110)10	2644(56)19	2700(95)12	2795(
17)25	2812(195) 4			
Sau96 I	g/gncc 29	1(69)15	70(1)29	71(
137) 9	208(13)26	221(6)28	227(30)21	257(
44)18	301(55)17	356(7)27	363(388) 1	751(
201) 5	952(23)22	975(118)10	1093(15)25	1108(
116)11	1224(151) 7	1375(108)12	1483(18)24	1501(
285) 3	1786(98)13	1884(73)14	1957(342) 2	2299(
173) 6	2472(42)19	2514(1)30	2515(218) 4	2733(
65)16	2798(151) 8	2949(39)20	2988(19)23	
Sec I	c/cnngg 29	1(137) 9	138(73)12	211(
13)23	224(30)18	254(74)11	328(16)21	344(
15)22	359(46)16	405(61)13	466(263) 4	729(
243) 6	972(22)19	994(37)17	1031(1)25	1032(
249) 5	1281(332) 2	1613(1)26	1614(273) 3	1887(
502) 1	2389(101)10	2490(20)20	2510(1)27	2511(
51)15	2562(11)24	2573(1)28	2574(161) 8	2735(
1)29	2736(1)30			

			2737(57)14	2794(213) 7	
Nla IV	ggn/ncc	30	1(69)15	70(230) 3	300(
1)29	301(31)20		332(30)22	362(1)30	363(
181) 6	544(285) 2		829(46)17	875(99)14	974(
52)16	1026(29)23		1055(38)19	1093(14)28	1107(
152) 9	1259(115)12		1374(109)13	1483(147)11	1630(
353) 1	1983(151)10		2134(165) 8	2299(173) 7	2472(
42)18	2514(1)31		2515(195) 4	2710(23)24	2733(
185) 5	2918(31)21		2949(20)25	2969(19)26	2988(
19)27					
Hae III	gg/cc	32	1(70)14	71(138) 9	209(
13)30	222(6)32		228(30)22	258(62)16	320(
179) 4	499(55)19		554(167) 7	721(30)23	751(
174) 5	925(28)25		953(23)26	976(22)27	998(
447) 1	1445(57)17		1502(8)31	1510(30)24	1540(
189) 3	1729(57)18		1786(172) 6	1958(110)10	2068(
297) 2	2365(107)11		2472(43)20	2515(106)12	2621(
21)28	2642(5)33		2647(86)13	2733(65)15	2798(
42)21	2840(148) 8		2988(19)29		
Fnu4H I	gc/ngc	33	1(30)22	31(53)19	84(
30)23	114(89)17		203(26)25	229(43)20	272(
3)32	275(222) 3		497(146) 6	643(98)15	741(
24)26	765(123)11		888(379) 1	1267(23)27	1290(
99)14	1389(3)33		1392(36)21	1428(9)30	1437(
9)31	1446(226) 2		1672(126) 9	1798(113)12	1911(
3)34	1914(126)10		2040(132) 8	2172(10)29	2182(
84)18	2266(109)13		2375(29)24	2404(138) 7	2542(
171) 5	2713(91)16		2804(14)28	2818(189) 4	
ScrF I	cc/ngg	40	1(62)18	63(28)28	91(
48)23	139(72)13		211(13)37	224(30)27	254(
6)38	260(69)14		329(15)35	344(15)36	359(
107) 8	466(506) 1		972(28)29	1000(32)26	1032(
27)30	1059(58)19		1117(66)16	1183(80)11	1263(
97) 9	1360(177) 5		1537(76)12	1613(1)39	1614(
112) 7	1726(234) 2		1960(66)17	2026(117) 6	2143(
33)25	2176(186) 4		2362(94)10	2456(55)22	2511(
23)31	2534(40)24		2574(1)40	2575(69)15	2644(
56)21	2700(20)32		2720(16)34	2736(1)41	2737(
58)20	2795(17)33		2812(195) 3		

Mnl I	cctc	7/7	61	1(7)49	8(4)58	12(
7)50	19(7)51		26(12)45	38(3)61	41(
9)47	50(53)21		103(30)30	133(17)38	150(
155) 4	305(13)44		318(55)20	373(134) 5	507(
4)59	511(18)37		529(220) 2	749(22)33	771(
5)55	776(9)48		785(56)17	841(15)39	856(
67)15	923(73)13		996(44)24	1040(34)28	1074(
56)18	1130(68)14		1198(15)40	1213(112) 7	1325(
156) 3	1481(6)53		1487(99) 9	1586(49)23	1635(
23)32	1658(105) 8		1763(26)31	1789(22)34	1811(
38)27	1849(78)11		1927(359) 1	2286(33)29	2319(
4)60	2323(3)62		2326(14)42	2340(5)56	2345(
56)19	2401(7)52		2408(6)54	2414(10)46	2424(
5)57	2429(133) 6		2562(42)25	2604(15)41	2619(
98)10	2717(14)43		2731(52)22	2783(64)16	2847(
78)12	2925(22)35		2947(20)36	2967(40)26	

802 sites found

No Sites found for the following Restriction Endonucleases

Aat II	gacgt/c		EcoR V	gat/atc		Pml I	cac/gtg
Afl II	c/ttaag		Esp I	gc/tnagc		Pvu I	cgat/cg
Afl III	a/crygt		HgiE II	accnnnnnggt		Rar II	cg/gwccg
Ase I	at/taat		HinD III	a/agctt		Sca I	agt/act
Avr II	c/ctagg		Hpa I	gtt/aac		Sfi I	
BanH I	g/gatcc		Mlu I	a/cgogt		SnaB I	tac/gta
Bbe I	gggoc/c		Nar I	gg/cgcc		Spe I	a/ctagt
Bbv II	gaagac	2/6	Nhe I	g/ctagc		Sph I	gcatg/c
Bcl I	t/gatca		Not I	gc/ggccc		Spl I	c/gtacg
BsaA I	yac/gtr		Nru I	tcg/cga		Ssp I	aat/att
BspH I	t/catga		Nsi I	atgca/t		Xca I	gta/tac
BatB I	tt/cgaa		Nsp7524 I	r/catgy		Xho I	c/tcgag
Cla I	at/cgat		NspH I	rcatg/y		Xmn I	gaann/nnttc
EcoR I	g/aatcc		PaeR7 I	c/tcgag			

RESUME/SUMMARY

Les μ - et m-calpaines sont des cystéines endopeptidases appartenant au système protéolytique neutre calcium-dépendant et sont fortement impliquées dans la myogenèse. L'apparition séquentielle de ces deux protéases lors de ce processus laisse supposer qu'elles possèdent des rôles biologiques différents lors de la différenciation de la cellule musculaire et donc des implications distinctes, suite à leurs dérégulations, dans certaines pathologies dont les dystrophies musculaires. Ainsi, notre étude a tenté de discriminer le rôle de la μ -calpaine en créant une lignée de myoblastes de souris capable de la surexprimer, reproduisant *in vitro* les événements observés chez ces patients (i.e. augmentation de l'activité de la protéase). Les conséquences ont été suivies au niveau ultrastructural, de la fusion, ainsi que sur plusieurs protéines, substrats potentiels de cette protéase (facteurs de transcription myogéniques et protéines du cytosquelette). Il semblerait que la μ -calpaine intervienne dans les voies de régulation de la myogenèse *via* son action sur la myogénine ainsi que sur l'eitrine, la vimentine et la cavéoline 3.

μ - and m-calpains are intracellular nonlysosomal cysteine proteases that belong to the calcium-activated neutral proteolytic system and are involved in myoblast fusion. Several studies have already demonstrated that calpains do not appear simultaneously all along muscle cell differentiation. According to these results, it seems that μ and m-calpains could have different biological roles during this process and so different involvements, after their deregulations, in muscular dystrophies. The goal of this study was to discriminate the role of the μ -calpain during muscle cell differentiation. We have firstly elaborated a muscle cell line in which the expression level of μ -calpain was overexpressed, allowing to mimick *in vitro* a part of the events occurring in patients (i.e. an increase of μ -calpain activity). The consequences were followed on an ultrastructural point of view during as well as on myoblasts fusion and on different proteins, which are considered to be potential substrates of the protease (myogenic factors and cytoskeletal proteins). Data obtained from our study indicate that μ -calpain seems to be involved in myogenesis regulation pathway *via* at least its action on myogenin (a myogenic transcription factor) and ezrin, vimentin and caveolin-3.

Mots clés : *calpaine, protéolyse, myogenèse, dystrophies, lignée cellulaire C2C12, facteurs myogéniques, eitrine, vimentine, cavéoline 3*

Key words : *calpain, proteolysis, myogenesis, dystrophies, C2C12 cell line, myogenic factors, ezrin, vimentin, caveolin-3*

Intitulé et adresse du laboratoire

Laboratoire Biosciences de l'Aliment
ISTAB, U.S.C.-I.N.R.A. 429, Université Bordeaux 1
Avenue des Facultés
33405 TALENCE cedex