

UNIVERSITE DE LIMOGES  
Faculté des Sciences et Techniques  
Ecole Doctorale Sciences, Technologie, Santé ED 258

Institut des Sciences de la vie et de la Santé  
Unité de Génétique Moléculaire Animale  
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Année 2005

Thèse n° 22-2005

**Thèse**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Peggy Raynaud**

Le 7 Juillet 2005

**Structure, régulation, expression et polymorphismes du  
gène *CAST* codant la calpastatine bovine.**

Directeurs de Thèse : Hubert Levéziel & Valérie Amarger

Jury :

**Rapporteurs :** M. Patrick Cottin  
M. Jean-François Hocquette  
**Examineurs :** M. Tim Parr  
M. Abderrahman Maftah  
M. Hubert Levéziel  
Me. Valérie Amarger

Professeur, Université de Bordeaux I  
Directeur de Recherche, INRA  
Lecturer, University of Nottingham  
Professeur, Université de Limoges  
Directeur de Recherche, INRA  
Chargé de Recherche, INRA



UNIVERSITE DE LIMOGES  
Faculté des Sciences et Techniques  
Ecole Doctorale Sciences, Technologie, Santé ED 258

Institut des Sciences de la vie et de la Santé  
Unité de Génétique Moléculaire Animale  
UMR 1061 INRA/Université de Limoges

Année 2005

Thèse n° : 22-2005

**Thèse**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Peggy Raynaud**

Le 7 Juillet 2005

**Structure, régulation, expression et polymorphismes du  
gène *CAST* codant la calpastatine bovine.**

Directeurs de Thèse : Hubert Levéziel & Valérie Amarger

Jury :

**Rapporteurs :** M. Patrick Cottin  
M. Jean-François Hocquette  
**Examineurs :** M. Tim Parr  
M. Abderrahman Maftah  
M. Hubert Levéziel  
Me. Valérie Amarger

Professeur, Université de Bordeaux I  
Directeur de Recherche, INRA  
Lecturer, University of Nottingham  
Professeur, Université de Limoges  
Directeur de Recherche, INRA  
Chargé de Recherche, INRA



*« Oublie que t'as aucune chance... vas-y fonce ! »*

*J-C Duss.*



*A mes parents,  
A Michael.*



## Remerciements

*Après quatre années de travail, il est difficile de trouver les mots justes pour remercier tous ceux qui m'ont apportée un soutien professionnel mais surtout personnel. Et même si je pense que les choses non dites sont souvent les plus importantes, je vais tout de même tenter de réaliser cet exercice dit des remerciements.*

*Je souhaite remercier tout d'abord les membres du jury, pour le temps précieux qu'ils ont accordé à ce travail : Monsieur Abderrahman Maftah, le président, Messieurs Patrick Cottin et Jean-François Hocquette, les rapporteurs, Monsieur Tim Parr, Monsieur Hubert Levéziel et Mademoiselle Valérie Amarger.*

*Je remercie également Monsieur Raymond Julien pour m'avoir accueillie, il y a maintenant un certain nombre d'années, au sein de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Tim Parr. Thanks a lot Tim for our short but useful collaboration and for your participation in this last step of my thesis.*

*Merci Hubert pour votre soutien et pour m'avoir supportée pendant ces 5 années (j'espère vraiment ne pas avoir trop de caractère !).*

*Un grand merci Valérie pour tout... pour avoir accepté « le boulet », pour ton soutien, ta franchise et tes conseils, et surtout pour avoir cru en moi. J'espère que nous passerons encore des soirées bières/flammekeuches ailleurs qu'à Limoges.*

*Merci Marie-Pierre et Chantal pour votre aide, sans vous qu'aurait été mon étude de promoteurs. Je regretterais nos conversations dans la salle de culture ou dans la salle du cytomètre (chacune reconnaîtra son territoire ...).*

*Merci à Fabrice, mon premier mentor (sans qui je ne me serais donc probablement jamais lancée dans cette voie semée d'embûches), et à Agnès pour nos discussions professionnelles, ou celles qui l'étaient beaucoup moins, dans le légendaire labo 4/5 et à la salle fumeurs de plein air.*

*Je tiens à souhaiter « bon courage » à tous les futur docteurs et futur thésards qui sont encore au labo : Sandrine, Fanny, Florence, Magalie, Matthieu, Benoît, Aurélien et Amro. Tenez-bon, c'est si agréable quand on voit le bout (du tunnel !!!).*

*Merci également à toutes les personnes du laboratoire qui ont contribué à ce travail de près ou de loin.*

*J'ai également une petite pensée pour les futurs docteurs de passage, Chung-Ming et Elena. Merci Chung-Ming pour tous ces bons moments passés à Tokyo, tu es un guide touristique atypique. Merci Elena pour ta bonne humeur constante, j'espère qu'on ce verra cet été en Italie. Nella speranza di rivederti presto e molte grazie per la traduzione.*

*Je remercie bien sûr mon aide de camp de la dernière heure (voir même de la dernière chance...), Mélaniche. Toujours prête à faire un western contre vents et marées. J'espère que je n'ai pas été un « petit chef » temporaire trop exigeant. Merci beaucoup pour ta bonne humeur, ton soutien et bien sûr pour ton aide, et méfies toi toujours de l'anticorps secondaire. Et tu sais tu vauх bien plus que ce que tu ne penses.*

*J'en viens tout naturellement au nouveau et futur-ex « petit chef » de Mélanie, et par ailleurs futur « grand chef », Dragan. Merci pour les discussions et les repas à l'improviste que nous avons eus. Bonne chance pour ta nouvelle vie.*

*Maintenant passons à la fine équipe, et une fois n'est pas coutume commençons par le sexe faible, je veux bien sûr parler du sexe masculin.*

*Christophe, tout ce chemin parcouru... les binouzes en terrasse, les vacances en Espagne, les discussions où l'on refaisait le monde... et parfois même les binouzes en Espagne en refaisant le monde. Quant je t'ai connu, tu n'étais pas encore docteur et aujourd'hui tu es chef d'entreprise, le temps passe vite, tu réponds toujours présent et je sais que ce sera encore le cas dans 10 ans. Je te remercie pour ta gentillesse, ton humour et ta générosité. Je ne doute pas que nous retournerons « emprunter » de la Zubrowska au Récamier et de toute façon je ne te lâcherais pas si facilement !!!*

*A toi Sylvain le bourru au grand cœur, merci pour tes fabuleux jeux de mots, ton objectivité, ta franchise, tes encouragements et pour être mon ami (enfin je crois !). J'espère que tu continueras à nous battre au « Trivial Pourcuite » et autre jeux pendant les longues soirées d'hiver à Uppsala ou ailleurs. Je te promets que je ne te ferais plus de poulet Tandoori avec du Raita, vive le cassoulet !*

*Alors Vincent, qu'est-ce que tu racontes ? Merci à toi pour tous les moments de détente passés ensemble, pour nos discussions autour d'un bon saucisson, pour les barbecues et les bonnes bouffes à Catheraud.*

*Reste Lionel, dit Jack Malone, merci pour ces soirées Bordelaises inoubliables, les discussions de génétique à 2h du mat. Tu sais un jour nous partirons tous les quatre en Australie... ce n'est qu'une question de temps.*

*Maintenant les meilleures, les filles que je remercie toutes pour les soirées filles bi-hebdomadaires, soirées de commérages comme on en fait plus.*

*Madame Carole, peu de choses à dire que tu ne saches déjà. En tout cas, une chose est sûre tu tiens tes promesses, tu es là pour ma thèse. Merci, entre autre, pour ton soutien inconditionnel, ton écoute, tes conseils, ton humour mais surtout pour ton amitié sans faille. Je te passe avec plaisir un peu de ma chance récemment acquise, je sais que tu en feras bon usage. Et Bonne Chance.... surtout !!!*

*A toi Céline, ma petite poulette, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta générosité. Je n'oublierais pas nos soirées Robert Redford (je te jure que j'arrive à pleurer des fois !) et j'espère qu'il y en aura d'autres. Bon courage, tu arrives à la fin. Je serais toujours là pour toi et je répondrais présente pour ta thèse, ne te fais pas de soucis.*

*Ma petite Lydoche, que te dire. Merci pour ton soutien, pour avoir partagé un bureau avec moi et avoir supporté mes angoisses et mes paniques, pour tous les bons moments mais aussi pour avoir été là quand j'en avais besoin. Ça y est nous y sommes arrivées, une nouvelle vie s'offre à nous et j'espère tu feras toujours partie de la mienne et moi de la tienne.*

*Loulou, la reine du potin. Merci pour ton humour, ta bonne humeur et pour avoir essayé de me mettre à la page au sujet des peuples. Surtout garde ton petit haut à pois, je crois qu'il plaît beaucoup aux hommes. Grâce à toi je sais au moins que Sim n'est pas mort !*

*Mia cara Valentina, sorellina mia italiana. Grazie per le giornate «shopping», le serate «football» e per avermi permesso di conoscerti. Grazie dal profondo del mio cuore per aver fatto tutta questa strada per essere qui presente in questo giorno.*

*A vous les Clermontois : Anne-So, Emma, Melanie, Damien, David et Bubu, merci pour tous les week-ends passés et à venir. Mon petit Bubu, je te remercie de m'accueillir à chaque fois bras ouverts dans ta demeure. Merci pour ta gentillesse, ta générosité, ta bonne humeur, pour les croissants au petit déjeuner enfin merci d'être là. Ma très chère Madame Poulette, tu sais quelles sont mes pensées mais merci quand même pour les virées au Comptoirs, pour toutes nos discussions, téléphoniques ou non, et merci d'être toi tout simplement.*

*Anne-Laure, Steph et Gael, mes amis de Fac, mes compagnons de tarot et de Tequila. Ma petite Steph, j'espère qu'on fêtera ça à ton retour de Montréal. Ce sera bientôt ton tour mais je ne me fais aucun souci pour toi.*

*Merci Anne-Laure de penser à moi régulièrement, d'essayer de comprendre comment fonctionne mon monde et d'être là tout simplement. Bonne chance pour ta nouvelle vie d'épouse. Merci Gael d'être toujours là.*

*Merci à mes amis d'enfance, Seb, Sandra, Bertrand, Milou, Seb et Arnod qui ont partagé plus particulièrement le début de cette thèse et qui sont toujours là. Même si l'on se voit moins je sais que vous serez toujours là pour moi. Je tiens à remercier plus particulièrement Seb, je tiens à toi et à ton amitié et merci d'être toujours là malgré tout.*

*Je ne peux oublier de remercier ma famille. Il n'y a pas de mots pour remercier ceux sans qui (c'est sûr !) je ne serais pas là. Merci pour tout sans exceptions mais surtout pour votre amour. Merci à mon petit frère, que j'aime même quand il est ronchon. Merci à mes grands-parents pour leur soutien et pour être là.*

*Je tiens à remercier également ceux qui ne peuvent être là physiquement mais qui sont présents dans mon coeur. Mon Papy Jean-Marie, Jacky et Pépé et Mémé Aze qui aurait été heureux d'être là.*

*Enfin mon cher MiKa, merci pour tout ce que tu m'apportes, pour ton soutien sans limite, pour tout ce qu'on partage et pour tout ce qu'il est difficile de dire ici et maintenant...*

*Je terminerais en remerciant tous ceux que je n'ai pas cités mais qui sont présents. Merci à tous et à toutes.*



## ***Liste des abréviations***

*ACE* : Gène codant l'angiotensine convertase

*ADN* : Acide Désoxyribonucléique

*ADNc* : Acide Désoxyribonucléique

complémentaire

*AMPc* : Adénosine MonoPhosphate cyclique

*ARN* : Acide Ribonucléique

*BAC* : Bacterial Artificial Chromosome

*BSA* : Albumine Sérique Bovine

*CAT* : Chloramphenicol Acétyl Transférase

*C2C12* : lignée myoblastique de souris

*CAPN1* : Gène codant la grande sous-unité de la  $\mu$ -calpaïne

*CAPN2* : Gène codant la grande sous-unité de la m-calpaïne

*CAPN3* : Gène codant la petite sous-unité des calpaïnes

*CAPN4* : Gène codant la calpaïne 3 (p94 et Lp82)

*CAPN10* : Gène codant la calpaïne 10

*CAPNS1* : Gène codant la petite sous-unité des calpaïnes

*CAST* : Gène codant la calpastatine

*CMV* : CytoMegaloVirus

*COS7* : lignée cellulaire de rein de singe vert de madagascar transformées par SV40

Da et kDa : Daltons et kiloDaltons

dNTP et ddNTP : DésoxyNucléotide

TriPhosphate et DiDésoxyNucléotide TriPhosphate

*DNF* : Dégénérescence NeuroFibrillaire

*EDTA* : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

*EGFP* : Enhancer Green Fluorescent Protein

*mGPDH* : glycérol-3-phosphate déhydrogénase

mitochondriale

*IP* : Iodure de Propidium

*LB* : Luria Bertoni

*LGMD2A* : Dystrophie des ceintures de Type 2A

*MA* : Maladie d'Alzheimer

*MyoD* : Myoblast Determination gene

*Myf5* : Myogenic Factor 5

pb, kpb et kb : paire de bases, kilopaires de bases, et kilobases

*PCR* : Réaction en Chaîne de Polymérisation

*PKA, PKC* : Protéine Kinase A et C

*QTL* : Quantitative Trait Loci

*RACE-PCR* : Amplification Rapide des Extrémités d'ADNc-Réaction en Chaîne de Polymérisation

*RT-PCR* : transcription inverse-Réaction en Chaîne de Polymérisation

*SDS, SDS-PAGE* : Sodium Dodécyl Sulfate, Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

*SNP* : Single Nucleotide Polymorphism

*SSCP* : Single Strand Conformation Polymorphism

*TE* : Tris-EDTA

*TEMED* : TétraméthylèneDiamine

*TPA* : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

*UTR* : Région non traduite



## ***Publications et communications***

### ***Publications***

**Raynaud P.**, Jayat-Vignoles C., Laforêt M-P, Levéziel H., Amarger V. (2005). Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 437 : 69-77.

**Raynaud P.**, Gillard M., Parr T., Bardsley R., Amarger V., Levéziel H. (2005). Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. *Accepté dans Archives of Biochemistry and Biophysics.*

**Raynaud P.**, Forestier F., Renand G., Amarger V., Levéziel H. (2005). Analysis of two new SNPs in the bovine calpastatin gene. *Soumis dans Animal Genetics*

### ***Communications orales***

**Raynaud P.**, Amarger V., Jayat C., Laforêt M-P, Julien R., et Levéziel H. (2004) Regulation of the calpastatin gene. 5<sup>th</sup> Polish-French Symposium, 22-23<sup>th</sup> September, Paris, France.

**Raynaud P.**, Pélissier P., Bremaud L., Amarger V., Julien R., Ouali A. et Levéziel H. (2003) Etude des gènes d'inhibiteurs de protéases. 10<sup>ème</sup> Rencontre Recherche Ruminants, 3 et 4 Décembre, Paris, France

**Raynaud P.** (2003) Structure, expression, régulation et polymorphismes du gène CAST bovin. 5<sup>ème</sup> Séminaire des thésards du Département de Génétique Animale de l'INRA. Mai, Jouy-en-Josas, France.

### *Communications écrites*

**Raynaud P.**, Amarger V., Julien R., Jayat C. et Levéziel H. (2004) Structure, expression and regulation of the bovine calpastatin gene. 29<sup>th</sup> International Conference on Animal Genetics, 11-16<sup>th</sup> September, Tokyo, Japan.

Champolini R., Cetica V., Ciani E., Mazzanti E., Fosella X., **Raynaud P.**, Biagetti M., Sebastiani C., Papa P., Cianci D. et Presciuttini S. (2004) Genetic variability among four cattle breeds prevalent in the Italian beef market and the traceability of the individual multilocus profile. 29<sup>th</sup> International Conference on Animal Genetics, 11-16<sup>th</sup> September, Tokyo, Japan.

**Raynaud P.**, Pélissier P., Bremaud L., Amarger V., Julien R., Ouali A. et Levéziel H. (2003) Etude des genes d'inhibiteurs de protéases. 10<sup>ème</sup> Rencontre Recherche Ruminants, 10 : 37-40.

Amarger V., Bremaud L., Delourme D., Grandjean F., Pélissier P., **Raynaud P.**, Rouhaud L., Julien R., et Levéziel H. (2002) Développement musculaire et qualité des viandes. 9<sup>ème</sup> Journées des Sciences du Muscle et Technologies de la Viande, 15-16 Octobre, Clermont-Ferrand, France.

Saunier K., Hayes H., **Raynaud P.**, Eggen A., Julien R., Womack J.E., Petit J.M. et Levéziel H. (2002) Physical mapping of the bovine 18q24-q26 chromosomal region. 7WCGALP, 19-23<sup>th</sup> August, Montpellier, France.

### ***Structure, régulation, expression et polymorphismes du gène CAST codant la calpastatine bovine.***

La calpastatine est l'inhibiteur spécifique des calpaïnes ubiquitaires calcium-dépendantes, la  $\mu$ - et la m-calpaïne. Le système calpaïnes/calpastatine est impliqué dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques ainsi que dans la maturation de la viande bovine. Connaissant l'importance économique de la race bovine pour les professionnels de la viande, il apparaît important de clarifier le mode d'expression de la calpastatine. Nous avons établi la structure du gène codant la calpastatine bovine et démontré l'existence de quatre promoteurs dirigeant l'expression de quatre Types de transcrits (Type I, II, III et IV) différant par leur partie 5'. Les transcrits de Type I, II et III sont ubiquitaires alors que le Type IV est spécifique des testicules. Nous avons pu également démontré que le transcrit de Type III est associé à 3 extrémités 3' UTR de longueurs différentes. Grâce à l'utilisation de sérums dirigés contre des régions peptidiques spécifiques, la correspondance entre les transcrits de Type I, II et III et les isoformes protéiques a été établie. Enfin, deux nouveaux SNPs situés dans l'intron 8 et l'exon 30 ont été détectés. Ces deux SNPs ainsi que deux autres et un microstallite, déjà décrits, ont été génotypés sur une population de 82 individus Charolais et les haplotypes correspondants ont été déterminés.

Mots clés : calpastatine, calpaïne, *CAST*, protéolyse, tendreté, viande, bovin.

### ***Structure, regulation, expression and polymorphisms of the bovine calpastatin gene (CAST).***

Calpastatin is a specific endogenous inhibitor of the ubiquitous calcium dependent proteinases,  $\mu$ - and m-calpain. The calpain-calpastatin system is involved in various physiological and pathological processes as well as in the tenderisation process of bovine meat. Despite all the available informations concerning calpastatin, little is known about how this gene is regulated at the transcriptional and translational level, especially in bovine. Regarding the economic importance of that species for livestock industries, it appears clearly important to clarify some of the factors related to calpastatin gene expression. We established the bovine calpastatin gene structure and determined that four promoters direct the expression of four Types of transcripts (I, II, III and IV) differing in their 5' ends. Type I, II and III mRNA transcripts are ubiquitous while Type IV is testis-specific. We also demonstrate that Type III transcript is associated with three 3' UTR differing by their size. Using specific anti-peptide anti-sera, a correspondance between the Type I, II and III mRNA transcripts and calpastatin isoforms has been established. Finally, two new SNPs in intron 8 and exon 30 were detected. These two SNPs as well as two others and a microsatellite, previously described, were genotyped in a population of 82 Charolais individuals and the corresponding haplotypes were established.

Key words: calpastatine, calpain, *CAST*, proteolysis, tenderness, meat, cattle.



# Table des matières

Introduction	1
Exposé bibliographique	5
I. La famille des calpaïnes	7
A. Les calpaïnes ubiquitaires : $\mu$ - et m-calpaïnes	7
1) Structures protéiques déduites des séquences d'ADNc	7
a) Les sous-unités de 80 kDa	7
b) La sous-unité de 28 kDa	9
2) Structure cristallographique	11
3) Phosphorylations des calpaïnes	15
4) Séquences génomiques	15
a) Gènes codant les grandes sous-unités	15
b) Gène codant la petite sous-unité	16
B. La calpastatine	17
1) Structure protéique déduite de la séquence d'ADNc	17
2) Structure du gène codant la calpastatine (CAST)	19
3) Transcrits de calpastatine	21
4) Régulation transcriptionnelle de CAST	22
5) Isoformes protéiques de calpastatine	23
6) Phosphorylation de la calpastatine	26
C. Autres membres de la familles des calpaïnes	26
1) Les calpaïnes 3a (p94) et 3b (Lp82)	27
a) La calpaïne 3a (p94)	27
b) La calpaïne 3b (Lp82)	29
2) La calpaïne 10	29
3) Les « calpain-like » chez les plantes	30
II. Régulation et fonctionnement du système calpaïnes/calpastatine	31
A. Localisation cellulaire	33
B. L'autolyse	34
C. La question du calcium	35
D. L'inhibition des calpaïnes par la calpastatine	36
E. Spécificité de protéolyse	39
III. Fonctions physiologiques et implications pathologiques	40
A. Fonctions physiologiques	41
1) Migration et fusion des myoblastes	41
2) Transduction du signal	42
3) Cycle cellulaire	44
4) Régulation de l'expression des gènes	44

5) L'apoptose	45
B. Implications pathologiques	46
1) La dystrophie des ceintures de type 2A (LGMD2A)	46
2) Le diabète de type II	48
3) La maladie d'Alzheimer	49
4) La cataracte	50
V. Qualité des viandes et protéolyse	51
A. Maturation des viandes et tendreté	51
B. La protéolyse <i>post-mortem</i> : rôle du système calpaïnes/calpastatine	56
Matériels et méthodes	59
I. Matériel biologique	61
A. ADN génomique	61
B. Tissus	61
C. Anticorps	61
D. Lignées cellulaires	62
E. Vecteurs	62
II. Méthodes relatives aux acides nucléiques	62
A. Préparation d'ADN plasmidique	62
1) Mini-préparation et midi-préparation d'ADN plasmidique	62
2) Midi-préparation d'ADN de BAC	63
B. Préparation d'ARN	63
1) Préparation des ARN totaux	63
2) Purification des ARN totaux en ARN messagers	63
3) Dosage des ARN	64
C. Méthodes basées sur la réaction en chaîne de polymérisation (PCR)	64
1) Réaction de PCR (classique, « Touchdown », longs fragments)	64
2) RT-PCR	65
3) RACE-PCR (Rapid Amplification cDNA End's-PCR)	65
D. Electrophorèse d'acides nucléiques et purification	65
1) Electrophorèse en gel d'agarose	65
2) Purification des fragments d'ADN après séparation sur gel d'agarose	65
E. Clonage de fragments d'ADN	66
1) Ligation	66
2) Transformation bactérienne	66
F. Hybridation moléculaire	67
1) Migration et transfert sur membrane de fragments d'ADN : <b>Southern Blot</b>	<b>67</b>
2) Migration et transfert sur membrane d'ARN : <b>Northern Blot</b>	<b>67</b>
3) Hybridation d'une sonde d'ADN radiomarquée	67
a) Marquage de la sonde	67
b) Hybridation de la sonde, lavages et révélation	68

G. Séquençage	69
1) Séquençage selon la méthode de Sanger	69
2) Séquençage direct sur BAC	69
H. Recherche de polymorphismes de type SNP par la technique SSCP	70
1) Préparation des échantillons et des standards.	70
2) Electrophorèse et coloration au nitrate d'argent	70
I. Génotypage de microsatellite	71
J. Génotypage de SNP (Méthode Taqman®)	71
III. Méthodes relatives aux protéines	72
A. Préparation des échantillons protéiques	72
B. Dosage des protéines	72
C. Electrophorèse en gel Tris-Glycine	72
D. Analyse des protéines par immunodétection : Western blot	73
1) Transfert actif sur membrane de nitrocellulose	73
2) Hybridation des anticorps et lavages	73
3) Révélation	74
IV. Méthodes relatives aux cellules	74
A. Transfections transitoires	74
B. Analyse par cytométrie de flux	75
Résultats	77
I. Structure et régulation du gène <b>CAST</b> bovin	79
II. Analyse de l'expression du gène <b>CAST</b> (ARNm et isoformes protéiques)	93
III. Analyse des polymorphismes du gène de la calpastatine	105
Discussion & perspectives	115
Conclusion	127
Nouveau chapitre de la thèse	129
I. Place et enjeux de la thèse	131
II. Gestion du projet et moyens mis en œuvre	132
III. Compétences développées dans le cadre du projet	134
IV. Evaluation des retombées de la thèse	135
Références bibliographiques	137



## *Table des illustrations*

Figure 1. Structures protéiques schématisques des calpaïnes ubiquitaires humaines.	8
Figure 2. Structure cristallographique de la m-calpaïne sans calcium.	10
Figure 3. Localisation des sites de phosphorylation de la $\mu$ - et la m-calpaïne.	14
Figure 4. Structure protéique de la calpastatine.	18
Figure 5. Structure des gènes codant la calpastatine (CAST) publiée chez la souris, l'homme, le bovin et le porc.	18
Figure 6. Structures des transcrits de Type I, II, III et IV murin de calpastatine.	20
Figure 7. Structures des isoformes protéiques de calpastatine.	24
Figure 8. Structures protéiques des calpaïnes 3a, 3b et 10a.	28
Figure 9. Régulation et fonctionnement des calpaïnes	32
Figure 10. Modélisation de la fixation des sous-domaines A, B et C de la calpastatine à la m-calpaïne.	38
Figure 11. Distribution des mutations décrites dans le cadre de la LGMD2A sur le gène codant la calpaïne 3.	47
Figure 12. Illustration de l'évolution de la tendreté d'un muscle après abattage.	52
Figure 13. Illustration de l'évolution au cours du temps de la résistance des fibres musculaires.	54



# *Introduction*

Il y a environ 10 000 ans, la domestication des ancêtres des bovins que nous connaissons aujourd'hui, débuta notamment pour la production de viandes. L'élevage bovin pour la production de lait fut plus tardif, soit environ 4000 ans plus tard. Dès ces temps reculés, les hommes ont sélectionné les animaux pour leurs caractéristiques. C'est au cours des deux derniers siècles que la sélection s'est intensifiée et a conduit à l'apparition des différentes races bovines, chacune possédant des spécificités particulières vis-à-vis notamment des productions alimentaires : les races Normande et Prim'Holstein pour la production de lait et la Limousine et la Charolaise pour la production de viande, pour ne citer que ces exemples. Au départ, le but était de satisfaire quantitativement les besoins nutritionnels de chacun et ce but a été atteint dans les pays développés. Aujourd'hui, les exigences des consommateurs de ces mêmes pays ont évolué et la demande s'oriente vers une viande de meilleure qualité : qualités nutritionnelles, sanitaires et organoleptiques. Alors que les processus de traçabilité mis en place après la crise de la vache folle permettent un suivi sanitaire, l'amélioration des qualités nutritionnelles et organoleptiques est encore mal maîtrisée. La difficulté est bien sûr de trouver un bon équilibre dans un même morceau de viande entre l'apport nutritif et le plaisir de la dégustation. Cependant, les caractéristiques recherchées ne sont ni uniques, ni fixes. L'appréciation des qualités organoleptiques varie d'une époque à une autre, d'un pays ou d'une région à l'autre. Pour exemple, les japonais sont très friands d'une viande bovine contenant beaucoup de gras intramusculaire, c'est-à-dire très persillée, alors qu'à l'inverse les français préfèrent une viande peu persillée. Les caractéristiques d'une viande varient en fonctions de nombreux paramètres tels que l'alimentation de l'animal, son âge, son sexe, son mode d'élevage et même les techniques d'abattage et de conservation des carcasses (cas de la suspension pelvienne par exemple). Même si un long chemin reste à faire, aujourd'hui, de plus en plus de progrès sont réalisés concernant les origines génétiques et environnementales des propriétés organoleptiques et nutritionnelles d'une viande. C'est pourquoi, de nombreuses équipes de recherche s'attèlent, d'une part, à comprendre les mécanismes permettant l'obtention d'une viande de qualité et, d'autre part, à définir des marqueurs permettant la sélection des animaux.

Plusieurs approches sont utilisées pour déterminer quels gènes sont impliqués ou influencent les propriétés organoleptiques telles que la quantité de gras intramusculaire (le persillé), la tendreté, la couleur, la saveur et la jutosité. L'une des plus traditionnelle et des plus utilisée, est

la recherche de QTL (Quantitative Trait Loci), l'exemple le plus connu étant d'identification du gène codant la myostatine comme responsable du phénotype « culard » (hypertrophie musculaire bovine). Plus récemment, les approches transcriptomiques et protéomiques, deux autres approches systématiques, ont vu le jour et sont de plus en plus utilisées aujourd'hui. Ces trois types d'approches ne sont cependant pas complètement indépendantes et peuvent même être complémentaires. Par exemple, la désignation d'une région du génome comme responsable de la variabilité génétique d'un caractère particulier par la recherche de QTL, appelée primo-localisation, permet de réduire l'étude des gènes de la région ainsi définie par analyse transcriptomique et/ou protéomique. Une limite de ces approches globales est le choix des populations ou échantillons étudiés. En effet, même si l'approche QTL a permis l'identification du gène responsable du phénotype « culard », pour reprendre cet exemple, des cas d'hypertrophie musculaire dans certaines races, comme chez la Limousine, restent inexplicables à ce jour. Il est important que ces approches systématiques soient conduites conjointement au sein des organismes de recherche afin d'atténuer les limites de chacune d'entre elles. Une troisième approche plus spécifique, généralement appelée approche « gène candidat », consiste en l'étude d'un petit nombre de gènes. Ces gènes sont choisis selon leurs fonctions pouvant être liées au phénotype étudié, selon leur localisation dans une région QTL et/ou selon leur profil remarquable par analyse transcriptomique et/ou protéomique. Cette approche peut faire suite aux trois autres et est nécessaire pour comprendre comment un gène, identifié comme responsable, intervient pour l'obtention d'un phénotype particulier.

C'est dans ce type d'approche que s'inscrit la démarche scientifique de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale (UMR 1061 INRA/Université de Limoges) et plus particulièrement l'équipe « Génomique et muscle » au sein de laquelle j'ai réalisé mon projet de thèse. Cette équipe s'intéresse aux facteurs génétiques pouvant expliquer notamment le métabolisme des lipides et du glycogène dans le muscle, le développement du muscle et la tendreté. En ce qui concerne la tendreté, deux axes sont suivis : l'un consiste en l'étude des inhibiteurs de sérine protéases (les serpins) et l'autre, qui concerne directement mon projet de thèse, consiste en l'étude de l'inhibiteur des calpaïnes, la calpastatine. Les calpaïnes sont des endopeptidases calcium-dépendantes intracellulaires présentes dans le muscle et qui sont connues, notamment, pour être impliquées dans la protéolyse ménagée des fibres musculaires responsables de l'amélioration de la tendreté de la viande, survenant lors du processus de maturation des viandes. L'inhibiteur des calpaïnes, la calpastatine, est décrit comme le régulateur principal du système calpaïnes/calpastatine. Mon projet de thèse s'inscrit à la fois dans une démarche fondamentale et appliquée. La démarche fondamentale consiste en la compréhension

du fonctionnement du système notamment par l'étude de la structure, de l'expression et de la régulation du gène codant la calpastatine. La démarche plus appliquée consiste en l'étude des polymorphismes du gène de la calpastatine dans le but d'établir une liaison entre un haplotype particulier et des mesures de tendreté de la viande. Ces deux démarches convergent vers la même finalité : comprendre et expliquer la grande variabilité de la tendreté des viandes chez le bovin.

La première partie de ce mémoire, l'exposé bibliographique, est découpée en quatre chapitres : le premier concerne les caractéristiques des calpaïnes ubiquitaires, de la calpastatine ainsi que de quelques autres membres de la famille des calpaïnes, le second concerne le fonctionnement et la régulation du système calpaïnes/calpastatine, le troisième traite des rôles physiologiques et des implications pathologiques, potentiels et avérés, du système et enfin dans un quatrième et dernier chapitre, les aspects concernant la tendreté de la viande et l'implication du système calpaïne/calpastatine dans ce processus sont abordés. Les différentes techniques utilisées au cours de cette thèse sont décrites dans une seconde partie. Enfin, les résultats de mon travail de thèse sont présentés sous la forme de 3 articles et sont, dans une dernière partie, discutés et mis en perspectives.



# *Exposé bibliographique*



## I. La famille des calpaïnes

La famille des calpaïnes, plus communément appelée système calpaïnes/calpastatine, est composée de trois acteurs principaux : la  $\mu$ - et la m-calpaïne, dites calpaïnes ubiquitaires, et la calpastatine, le seul inhibiteur spécifique du système connu à ce jour. Ces endoprotéases sont calcium-dépendantes, appartiennent à la famille des cystéines protéases et entraînent généralement une protéolyse limitée de leurs cibles. Depuis de nombreuses années, cette famille s'est enrichie de nouveaux membres souvent appelés les « calpain-like » protéines. Dans ce chapitre, nous traiterons dans un premier temps des caractéristiques des composants principaux du système, puis nous exposerons les particularités de certains des nouveaux membres de la famille des calpaïnes.

### **A. Les calpaïnes ubiquitaires : $\mu$ - et m-calpaïnes**

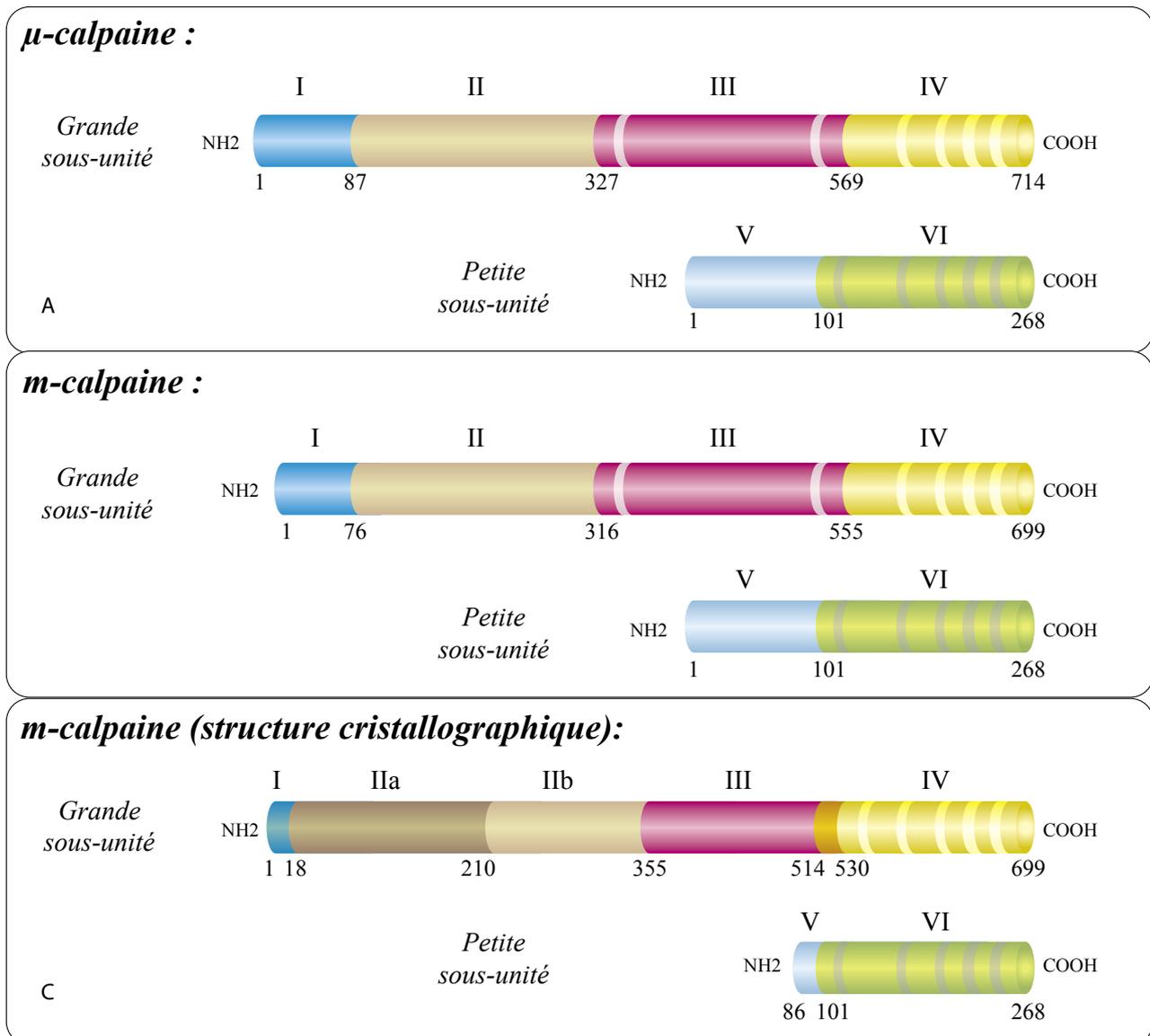
Les termes de  $\mu$ - et m-calpaïnes ont été évoqués pour la première fois en 1989 (Cong *et al.*, 1989) en faisant référence à la concentration micromolaire et millimolaire en  $\text{Ca}^{2+}$  requise pour l'activité de ces protéases. Elles sont également souvent appelées « ubiquitaires », « conventionnelles » ou « typiques ».

#### **1) Structures protéiques déduites des séquences d'ADNc**

Les séquences d'ADNc codant pour la  $\mu$ - et la m-calpaïne ont été clonées et séquencées dans différentes espèces : humain (Aoki *et al.*, 1986), souris (Poirier *et al.*, 1998), rat (Deluca *et al.*, 1993), bovin (Smith *et al.*, 2000), porc (Smith *et al.*, 2001), lapin (Emori *et al.*, 1986a; Emori *et al.*, 1986b) et poulet (Ohno *et al.*, 1984). Ces protéases sont hétérodimériques, composée d'une grande et d'une petite sous-unité (Figure 1). La grande sous-unité a une masse moléculaire proche de 80 kDa, 81 889 Da pour la  $\mu$ - et 79 900 pour la m-calpaïne chez l'homme par exemple. La petite sous-unité, quant à elle, a une masse moléculaire autour de 28 kDa. La comparaison des séquences d'acides aminés a montré une forte identité entre les différentes espèces séquencées jusqu'ici. Dans les parties suivantes, les séquences humaines seront utilisées comme référence.

##### *a) Les sous-unités de 80 kDa*

Les sous-unités de 80 kDa de la  $\mu$ - et m-calpaïne présentent 55-65 % d'homologie de séquence dans une espèce donnée. L'analyse des séquences d'acides aminés a montré une structure à 4 domaines (Figure 1A et 1B). Le domaine I, situé en N-terminal, n'a d'homologie avec aucun



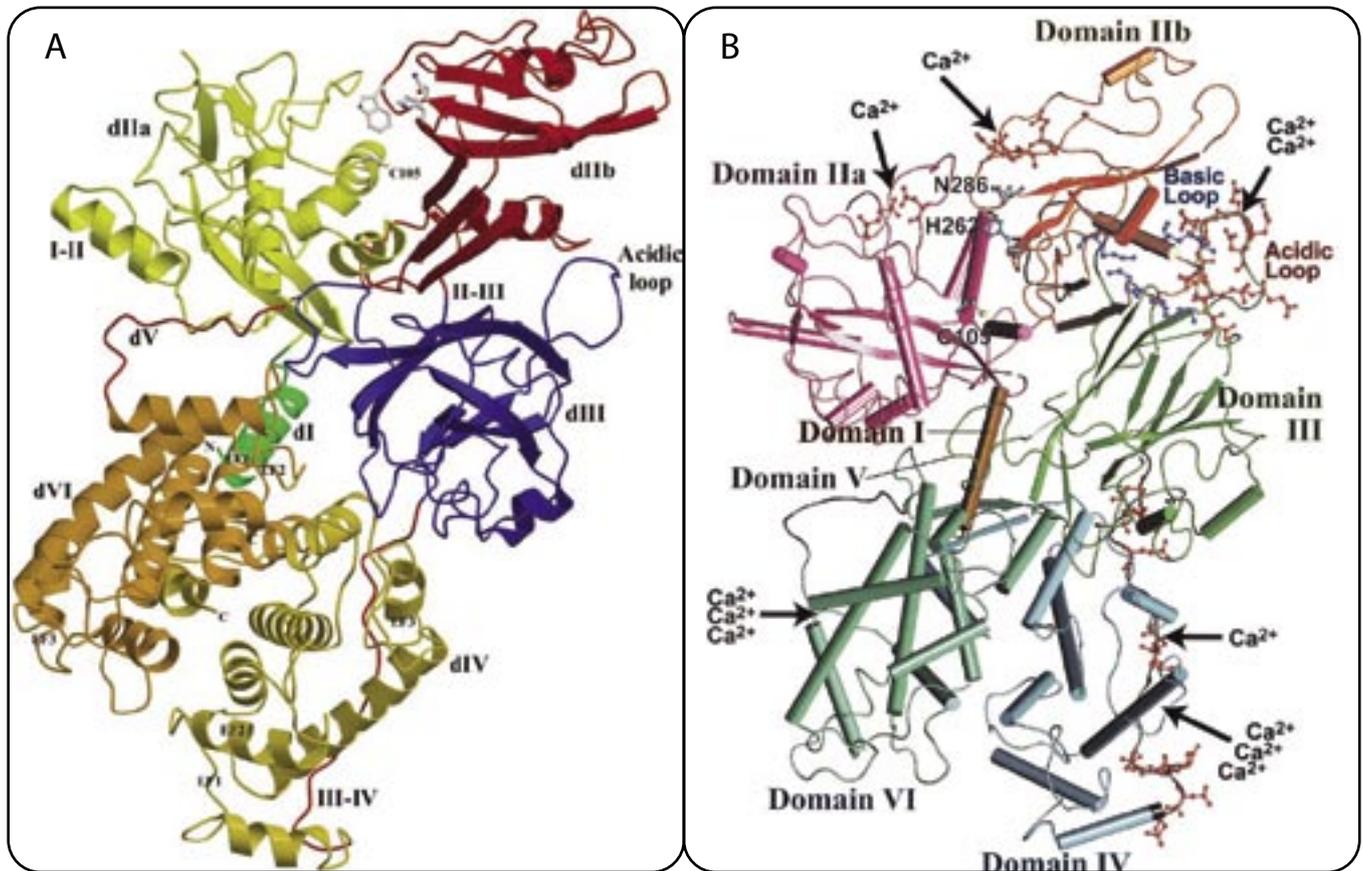
**Figure 1. Structures protéiques schématiques des calpaines ubiquitaires humaines.**

A : Structure de la  $\mu$ -calpaïne déduite des séquences protéiques. B : Structure de la m-calpaïne déduite des séquences protéiques. C : Structure de la m-calpaïne déduite de la structure cristallographique. Chaque domaine est représenté par une couleur différente, le domaine en orange sur la structure cristallographique de la m-calpaïne correspond au domaine de liaison (« linker »). Les bandes présentes dans les domaines III, IV et VI représentent les motifs de type « EF-hand ». La numérotation des acides aminés est valable pour les protéines humaines.

polypeptide séquencé jusqu'ici. Il présente 72-86 % d'identité entre les séquences d'homme, de poulet, de rat et de porc. Le domaine II représente le domaine catalytique. Chez l'homme, il comporte un résidu cystéine en position 115 ( $\mu$ -calpaïne) ou 105 (m-calpaïne), un résidu histidine en position 272 ( $\mu$ -capaïne) ou 262 (m-calpaïne) et un résidu asparagine en position 296 ( $\mu$ -capaïne) ou 286 (m-calpaïne). Ces trois acides aminés constituent la triade catalytique caractéristique des cystéines protéases comme la papaïne ou les cathepsines B, L ou S. Cependant, une faible homologie de séquence est observée entre ces différentes cystéines protéases, suggérant une évolution à partir de gènes ancestraux différents. La séquence du domaine III ne ressemble à aucune autre déjà décrite. En plus de faire la liaison entre le domaine catalytique et celui de fixation au calcium, le domaine III a été impliqué dans la fixation aux phospholipides (Tompa *et al.*, 2001). L'analyse de la séquence peptidique du domaine III a révélé la présence de deux motifs « EF-hand », aux frontières entre les domaines II et III, d'une part, et III et IV, d'autre part. La séquence du premier motif ne présente pas de conformation « EF-hand » typique dans la structure cristallographique de la m-calpaïne et ne semble pas fixer d'ion calcium. Cette région, à la frontière des domaines II et III, fixe cependant le calcium dans une autre calpaïne isolée chez *Schistosoma mansoni* (Andresen *et al.*, 1991). Mais, étant donné que seule la structure cristallographique de la m-calpaïne a été établie, sans présence de calcium, il est difficile d'affirmer que cette séquence fixe ou non le calcium. Enfin le domaine IV, comme le domaine VI de la petite sous-unité, est relativement homologue à la calmoduline (24-44 % et 51-54 % pour la  $\mu$ - et la m-calpaïne respectivement) et présentent quatre séquences du type « EF-hand » (Figure 1A et 1B). La structure cristallographique de la m-calpaïne a révélé que ce domaine commencerait plus en N-terminal (acide aminé 530 au lieu de 556) incluant ainsi la séquence « EF-hand » située à la frontière des domaines III et IV, décrite précédemment.

#### b) La sous-unité de 28 kDa

Elle est composée de deux domaines. Le domaine V (Figure 1), situé en N-terminal, est riche en glycine, 40 des 64 acides aminés sont des résidus glycine. Ils sont organisés en cluster de 11 et 20 résidus (Ohno *et al.*, 1986). De plus, ce domaine possède une région contenant cinq prolines en position 78 (PEPPPP) et quatre résidus glutamate en position 91 (EANESSE). Ce type de séquence suggère une structure désordonnée pouvant servir d'attache à d'autres molécules ou structures. Le deuxième domaine de la petite sous-unité, situé en C-terminal, correspond au domaine VI et est fréquemment assimilé à un domaine calmoduline. Cependant, seulement 23% d'identité avec la séquence d'acides aminés de la calmoduline humaine est observée. C'est la présence de quatre



**Figure 2. Structure cristallographique de la m-calpaïne sans calcium.**

A : Les domaines sont représentés par des couleurs différentes et nommés respectivement dI, dII, dIII, dIV, dV et dVI. Le domaine de liaison est représenté par une ligne rouge en bas à droite reliant les domaines dIII et dIV et est nommé III-IV. Les motifs EF-1, EF-2 et EF-3 des domaines IV et VI sont indiqués. Les acides aminés du site actif, Cys-105, His-262 et Asn-286, ainsi que le résidu Trp-288 sont en gris en haut de la structure (d'après (Goll *et al.*, 2003)).

B : Une autre vue schématique de la structure cristallographique de la m-calpaïne est représentée. Les sites de fixation potentiels des ions calcium sont indiqués (d'après (Suzuki *et al.*, 2004)).

« EF-hand » fixant l'ion calcium, mis en évidence lors de l'analyse des séquences d'acides aminés (Suzuki *et al.*, 1986), qui a permis la comparaison de ce domaine avec la calmoduline.

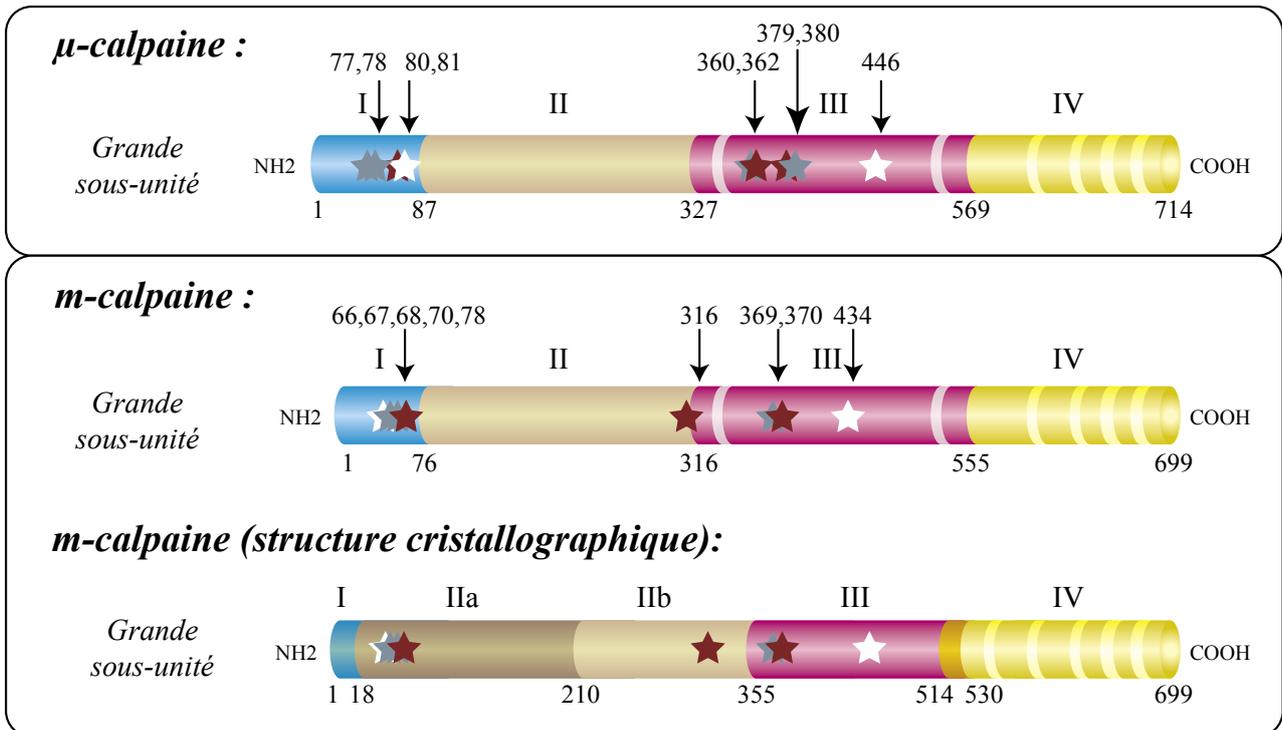
## 2) *Structure cristallographique*

C'est seulement depuis 5 ans que des informations sur la structure cristallographique des calpaïnes apparaissent. Tout d'abord, ce fut le domaine IV de la petite sous-unité qui fut cristallographié à une résolution de 2,3 (Blanchard *et al.*, 1997) puis de 1,9 Å (Lin *et al.*, 1997). Puis 2 et 3 ans plus tard, la structure cristallographique de la m-calpaïne de rat (Hosfield *et al.*, 1999) et d'homme (Strobl *et al.*, 2000) fut publiée. Par contre, les tentatives pour obtenir une structure cristallographique de la  $\mu$ -calpaïne ont échouées, et il n'est donc pas confirmé qu'elle se compose aussi de 6 domaines. Néanmoins, et sur la base de sa similarité de séquence avec la m-calpaïne suggérant des structures similaires, une structure pour la  $\mu$ -calpaïne a été élaborée (Reverter *et al.*, 2001b). Dans les paragraphes suivant, seuls les résultats obtenus pour la m-calpaïne seront exposés.

Les domaines VI de rat (Blanchard *et al.*, 1997) et de porc (Lin *et al.*, 1997) ont été exprimés chez *Escherichia coli*, et les deux structures obtenues sont similaires. L'analyse cristallographique aux rayons X a montré l'existence d'un site supplémentaire de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  en N-terminal des quatre autres mis en évidence par l'analyse des séquences du domaine VI, affiliant cette sous-unité à la famille des protéines à cinq « EF-hand ». Comme les calpaïnes, les membres de cette famille de protéines sont connus pour former des dimères impliquant les cinq « EF-hand », et pour s'associer aux membranes (Xie *et al.*, 2001). Ces cinq motifs sont appelés EF-1', EF-2', EF-3', EF-4' et EF-5'. Ces deux polypeptides ont d'ailleurs été cristallographiés en tant qu'homodimères, chacun des monomères ayant les motifs EF-1' et EF-2' dans des conformations dites « ouvertes » alors que les motifs EF-3' et EF-4' sont dans des conformations dites « fermées ». Le cinquième motif, EF-5', quant à lui, est impliqué dans la formation du dimère par la constitution d'interactions hydrophobes. Une bonne conservation des résidus impliqués dans ces interactions à des positions équivalentes sur les deux grandes sous-unités est observée. De plus, il a été démontré que la délétion de cette partie du polypeptide empêche la formation de l'homodimère (Elce *et al.*, 1997a; Minami *et al.*, 1988). Enfin, les structures cristallographiques de la m-calpaïne ont confirmé que le cinquième motif « EF-hand » des domaines IV et VI (EF-5 et EF-5') est impliqué dans l'association des sous-unités de 80 et de 28 kDa.

Les structures cristallographiques aux rayons X de la m-calpaïne de rat (Hosfield *et al.*, 1999) et humaine (Strobl *et al.*, 2000) ont été établies à partir de protéines exprimées respectivement dans les systèmes d'expression *Escherichia coli* et baculovirus. Ces deux structures ont été réalisées en absence de calcium et sont similaires. Les 85 premiers acides aminés de la petite sous-unité de rat ont été tronqués pour faciliter l'expression dans *E. coli*. Pour ce qui est de la protéine humaine, le domaine V de la petite sous-unité n'est pas représenté sur la structure (Figure 2). Par conséquent, aucune des structures cristallographiques de la m-calpaïne ne présente le domaine N-terminal de la sous-unité de 28 kDa (Domaine V). La structure cristallographique a mis en évidence l'existence de six domaines dans la grande sous-unité au lieu de quatre précédemment mis en évidence par l'analyse des séquences d'ADNc (Figure 1). Un court domaine N-terminal de 18 acides aminés, appelé domaine I (Figure 1C), est en contact avec le domaine VI. Le domaine catalytique est divisé en deux sur la structure cristallographique (Figure 1C). Le domaine IIa contient le résidu cystéine de la triade catalytique, alors que le IIb contient les deux autres résidus (Histidine et Asparagine). Le domaine III est plus court que celui déterminé par l'analyse des séquences peptidiques et se termine par une séquence de 18 acides aminés qui représente un domaine de liaison avec le domaine IV (domaine « linker »). Quoiqu'il en soit, la connaissance de la structure cristallographique de la m-calpaïne autorise quatre conclusions. Premièrement, le site actif de la protéine n'est pas obstrué par le domaine I comme on l'avait imaginé auparavant. Pour cette raison, la délétion du domaine I par le phénomène d'autolyse (voir paragraphe IIB) de la protéine n'est en aucun cas responsable de l'activation de la m-calpaïne comme c'est le cas pour beaucoup de proenzymes. Deuxièmement, la structure obtenue en absence de calcium correspond à une forme qui serait inactive du fait de la distance qui sépare la cystéine des deux autres résidus de la triade catalytique (10,5 Å), cette distance ne permettant pas la formation d'un complexe actif. Le calcium induit probablement un changement de conformation permettant une réduction de la distance séparant les résidus de la triade catalytique de 10,5 à environ 3,7 Å. Ce changement de conformation pourrait faire intervenir l'acide aminé tryptophane en position 288 présent dans le domaine IIb. En effet, il a été montré que la substitution de celui-ci en un résidu tyrosine, entraînait une diminution de plus 90 % de l'activité (Arthur *et al.*, 1995). Troisièmement, l'autolyse du domaine I, intervenant entre les acides aminés en position 19 et 20, a lieu à 40 Å de distance du site catalytique dans la structure sans calcium. Au regard de cette dernière donnée, il semblerait que cet évènement ne soit pas intramoléculaire. Enfin, la fixation de Ca<sup>2+</sup> pourrait avoir lieu au niveau de régions différentes des domaines IV et VI. En effet, il a été rapporté précédemment que la fixation de calcium au domaine VI n'entraînait

qu'un léger changement de conformation (Blanchard *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997) probablement insuffisant pour permettre la formation d'une triade catalytique active. Or, un groupe de résidus acides (aspartate et glutamate), très conservés, entre les positions 392 et 401 (domaine III, Figure 1), a été identifié. Certains d'entre eux forment des interactions ioniques avec des résidus lysine entre les positions 226 et 357, dans la structure cristallographique de la m-calpaïne. Le calcium pourrait casser ces interactions ce qui permettrait au domaine IIb de se rapprocher du IIa, engendrant ainsi la formation de la triade catalytique. Une étude récente a montré que les domaines IIa et IIb de la  $\mu$ -calpaïne pouvaient fixer un atome de calcium et que cette fixation entraînait un changement de conformation permettant le rapprochement des résidus de la triade à 3,5 Å de distance (Moldoveanu *et al.*, 2002). Malgré les données obtenues grâce à la structure cristallographique de la m-calpaïne, de nombreuses zones d'ombres quant au repliement et au fonctionnement des calpaïnes subsistent.



**Figure 3. Localisation des sites de phosphorylation de la  $\mu$ - et la  $m$ -calpaïne.**

Les structures schématiques protéiques déduites des séquences d'ADNc humaines de la  $\mu$ - et de la  $m$ -calpaïne ou de la structure cristallographique de la  $m$ -calpaïne sont représentées. Les phosphotyrosines, phosphosérines et phosphothréonines sont indiqués par des étoiles blanches, marron et grises respectivement. Les flèches indiquent la numérotation des différents acides aminés phosphorylés sur la protéine humaine.

### 3) *Phosphorylations des calpaïnes*

Même si une première étude avait montré que les calpaïnes n'étaient pas phosphorylées (Adachi *et al.*, 1986), de nombreuses autres, basées sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les résidus sérine, thréonine et tyrosine phosphorylés et sur la spectrométrie de masse ont mis en évidence des sites multiples de phosphorylation (Goll *et al.*, 2003). Ces deux types de méthodes ont prouvé l'existence respectivement de huit et neuf sites phosphorylés sur les grandes sous-unités de la m- et de la  $\mu$ -calpaïne (Figure 3). Par contre, une seule sérine phosphorylée a été mise en évidence, grâce à l'utilisation d'anticorps, dans le domaine V de la sous-unité de 28 kDa. Les acides aminés phosphorylés sont localisés principalement dans deux régions : à la jonction des domaines I et II et au niveau de l'extrémité N-terminale du domaine IIb (domaine II dans la structure déduite des séquences d'ADNc). Les acides aminés phosphorylés sont en position équivalente sur la  $\mu$ - et la m-calpaïne, exception faite des résidus en positions 360 et 362 sur la  $\mu$ -calpaïne et en position 316 sur la m-calpaïne. Tous les sites ne sont pas phosphorylés dans toutes les molécules. Les résidus 369-370 et 379-380 dans la m- et la  $\mu$ -calpaïne respectivement, sont phosphorylés dans la plupart des calpaïnes, les autres sites le sont moins fréquemment. En moyenne, chaque molécule de calpaïne contiendrait 2 à 4 phosphates. Le changement de toutes les phospho-sérines et phospho-thréonines conduit à une calpaïne quasiment inactive, soit moins de 15 % de l'activité originelle (Goll *et al.*, 2003). A ce stade, il est difficile de déterminer exactement le rôle de la phosphorylation, même s'il semble évident que l'activité protéolytique dépend au moins en partie de celle-ci.

### 4) *Séquences génomiques*

#### a) *Gènes codant les grandes sous-unités*

Les grandes sous-unités de la  $\mu$ - et de la m-calpaïne sont codées par deux gènes différents. Le gène codant la  $\mu$ -calpaïne (*CAPN1*) est composé de 19 exons répartis sur environ 30 kpb chez l'homme (bases de données), de 21 exons sur 28 kpb chez la souris (Azam *et al.*, 2001) et de 19 exons sur plus de 11kpb chez le bovin (Smith *et al.*, 2000). Celui codant la m-calpaïne (*CAPN2*) présente 20 exons répartis sur 64 kpb chez l'homme (bases de données), de 21 exons sur plus de 33 kpb chez le rat et de 21 exons chez le poulet (Emori *et al.*, 1986c).

Jusqu'à aujourd'hui, seules les régions promotrices de la m-calpaïne chez l'homme et le poulet ont été étudiées (Emori *et al.*, 1986c; Hata *et al.*, 1989; Hata *et al.*, 1992). La région promotrice

de la m-calpaïne ne possède ni boîte TATA ni boîte CAAT. De plus, plusieurs sites de démarrage de la transcription ont pu être identifiés, suggérant l'appartenance de ce gène à la famille des gènes de ménage. Des expériences de transfections transitoires utilisant le gène rapporteur CAT (Chloramphenicol Acétyl Transferase) ont montré l'existence de quatre éléments négatifs dans les 2,5 kpb en amont du démarrage de la transcription. La délétion de ces éléments entraîne une augmentation de l'activité du gène rapporteur de 13 fois. Trois de ces éléments négatifs diminuent l'activité transcriptionnelle de promoteurs hétérologues comme celui de la thymidine kinase (Hata *et al.*, 1989). D'autre part, il a été montré que l'incubation de cellules HeLa avec du 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induit une surexpression du gène codant la m-calpaïne. Aucune surexpression des gènes codant la  $\mu$ -calpaïne, la petite sous-unité et la calpastatine, n'a été observée (Hata *et al.*, 1992), suggérant une régulation spécifique de l'expression de chacun des gènes codant pour les protéines du système calpaïnes/calpastatine. Plus récemment, une analyse de la région promotrice du gène *CAPN2* a révélé la présence de 5 éléments de type « E-box » sur lequel se fixe différents facteurs de régulation myogéniques, et un élément MEF-2 (Myocyte enhancer factor-2) (Dedieu *et al.*, 2003a). Des expériences de cotransfections ont montré que le facteur de transcription MyoD, et Myogénine dans une moindre mesure, active l'expression d'un gène rapporteur présentant en amont différentes combinaisons des 5 motifs « E-box » et de l'élément MEF-2. De plus, l'introduction d'oligonucléotides antisens dirigés contre MyoD, Myf5 et Myogénine dans des cellules C2C12 (lignée myoblastique de souris) met en évidence un rôle prépondérant et spécifique de MyoD dans la régulation du gène *CAPN2* codant la grande sous-unité de la m-calpaïne.

#### b) Gène codant la petite sous-unité

La sous-unité de 28 kDa est codée par un seul gène situé sur le chromosome 19 humain (Ohno *et al.*, 1990). Ce gène (*CAPNS1* ou *CAPN3*) est composé de 11 exons réparti sur 11 kb chez l'homme (Miyake *et al.*, 1986) et d'environ 7 kpb chez la souris (Arthur *et al.*, 1998) et le porc (Drogemuller et Leeb, 2002). Les exons 7 à 10 codent chacun les motifs EF-2', EF-3', EF-4' et EF-5'. Seul le motif EF-1' est codé par deux exons, les exons 4 et 5. Comme pour la région promotrice de *CAPN2*, aucune boîte TATA ni CAAT n'a été observée dans la région promotrice de ce gène. L'existence de trois boîtes GC et de multiples sites de démarrage de la transcription suggèrent que ce gène appartient à la famille des gènes de ménage. A ce jour, aucun phénomène d'épissage

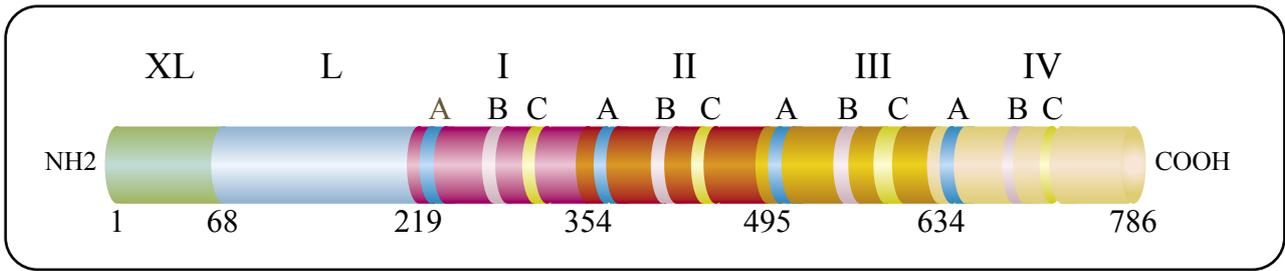
alternatif n'a été observé. Récemment, des séquences EST (Expressed Sequence Tag), similaires aux transcrits de ce gène, ont permis d'identifier un pseudogène chez l'homme et la souris. Ce gène code une protéine de 248 acides aminés ayant une masse moléculaire de 27 659 Da et 63 % d'homologie avec la séquence peptidique de la petite sous unité des calpaïnes (Schad *et al.*, 2002). Cette protéine de 248 acides aminés diffère de la petite sous-unité par l'absence des deux clusters de résidus glycines et par une plus faible fixation à la grande sous-unité. Une co-expression de cette séquence peptidique avec la sous-unité de 80 kDa de la m-calpaïne entraîne la formation d'une enzyme protéolytiquement active mais ne présentant que 70 % de l'activité de la m-calpaïne classique. De plus, la disruption du gène codant la petite sous-unité est embryonnairement létale, même en la présence de ce polypeptide. Ceci suggère que ce polypeptide de 248 acides aminés ne peut se substituer à la petite sous-unité, sa fonction restant méconnue.

## B. La calpastatine

La calpastatine est, à ce jour, le seul inhibiteur spécifique de la  $\mu$ - et de la m-calpaïne connu. Cette protéine a été initialement découverte lors d'expérience de purification de la m-calpaïne à partir d'extraits de muscle squelettique de porc où l'activité calpaïne n'était détectée qu'après précipitation, suggérant l'existence d'un inhibiteur qui n'est pas co-précipité (Dayton *et al.*, 1976). Ce nom lui a été donné en 1979 par Takashi Murachi. Dans cette partie, les données acquises sur la structure de la protéine, du gène, des transcrits, sur la régulation transcriptionnelle du gène et enfin sur les diverses isoformes protéiques et leur phosphorylation vont être exposées successivement.

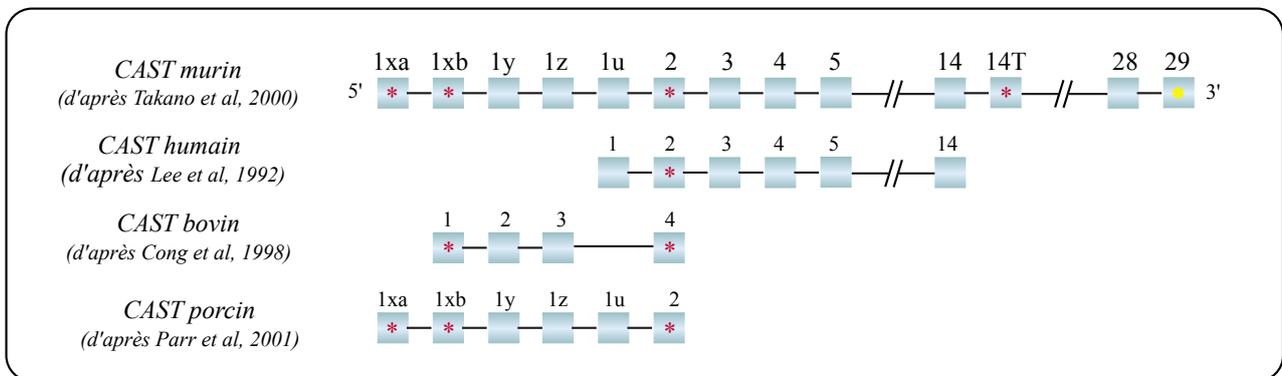
### 1) *Structure protéique déduite de la séquence d'ADNc*

L'analyse des diverses séquences d'ADNc (voir I. B. 3.) déjà décrites (Emori *et al.*, 1987; Takano *et al.*, 1988) a mis en évidence quatre domaines répétés, les domaines I, II, III et IV (Figure 4). Ces domaines font environ 140 acides aminés de long et présentent 23 à 36 % d'homologie entre eux. Des études d'expression de séquences d'ADNc tronquées ont montré que ces quatre domaines possédaient l'activité inhibitrice et pouvaient fonctionner comme des entités uniques (Emori *et al.*, 1988; Maki *et al.*, 1988). Chacun des domaines fixe et inhibe une molécule de calpaïne ce qui implique qu'une protéine entière de calpastatine peut inhiber jusqu'à 4 molécules de calpaïnes. Ils inhibent aussi bien la  $\mu$ - que la m-calpaïne mais il semblerait que la capacité d'inhibition spécifique de chaque domaine diffère. Le domaine I serait le plus efficace suivi du domaine IV, du III et enfin



**Figure 4. Structure protéique de la calpastatine.**

Chaque domaine (XL, L, I, II, III et IV) est représenté par des couleurs différentes. Les sous-domaines A, B et C sont indiqués en bleu, rose et jaune, respectivement. La numérotation des acides aminés est valable pour la protéine bovine, la séquence peptidique XL n'ayant pas encore été décrite chez l'homme (d'après (Cong *et al.*, 1998b)).



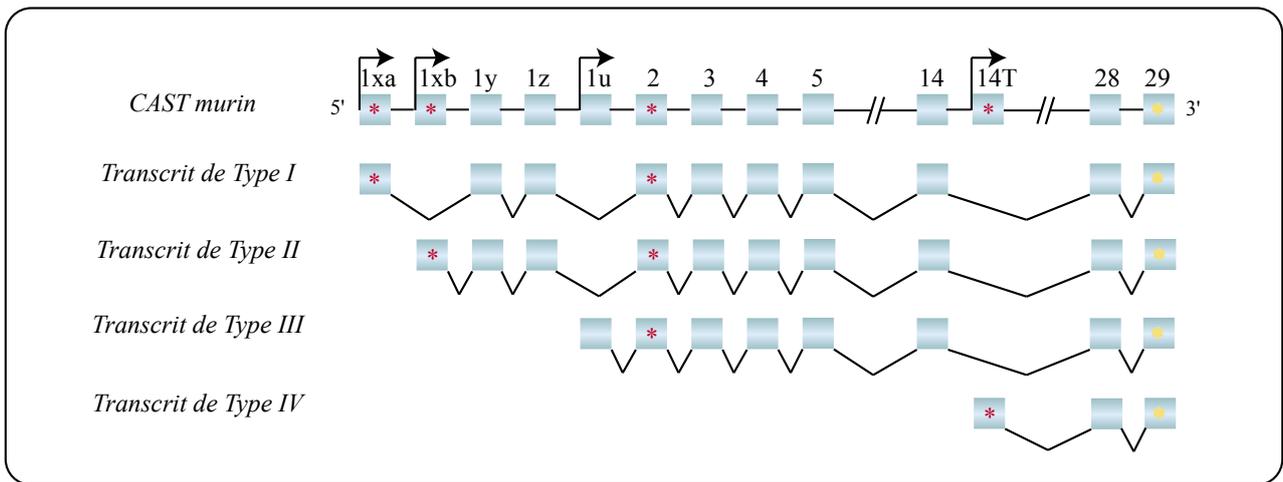
**Figure 5. Structure des gènes codant la calpastatine (CAST) publiée chez la souris, l'homme, le bovin et le porc.**

Les exons sont représentés par les boîtes bleues. Les noms qui leur ont été attribués dans les publications correspondantes sont indiqués au dessus de chacun d'entre eux. Les introns sont représentés par les traits noirs entre chaque exons. Les lignes noires entrecoupées montrent que la structure du gène, située entre les exons 5 et 14 chez l'homme et la souris et entre le 14T et 28 chez la souris, a été décrite mais n'est pas représentées sur la figure. Les étoiles rouges situées dans les exons 1xa, 1xb, 2 et 14T représentent les codons de démarrage de la traduction. L'étoile jaune dans l'exon 29, quant à elle, indique le codon stop.

le domaine II (Kawasaki *et al.*, 1989). Chacun de ces domaines présentent trois sous-domaines conservés, nommés A, B et C (Figure 4). Le sous-domaine B est essentiel pour l'inhibition. En effet, lorsqu'il est supprimé, aucune inhibition n'est observée (Kawasaki *et al.*, 1989; Maki *et al.*, 1989; Maki *et al.*, 1988). Les sous-domaines A et C, quant à eux, sont impliqués dans la fixation aux calpaïnes et se fixent aux domaines IV (Ma *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994) et VI (Takano *et al.*, 1995) des calpaïnes, respectivement. En plus de ces quatre domaines, un domaine en N-terminal, domaine L pour « leader », a été identifié (Figure 4). Il fait environ 80-150 acides aminés, cette différence de taille étant due à des phénomènes d'épissage alternatif très fréquents dans cette partie. Cependant, à ce jour, aucune fonction n'a pu être attribuée à ce domaine. Plus récemment, une séquence peptidique en N-terminal du domaine L, appelée XL (Figure 4), a pu être mise en évidence (Cong *et al.*, 1998b). Jusqu'à présent aucune fonction n'a pu être attribuée à cette séquence. Seuls, des sites de phosphorylations pour la PKA ont été identifiés sur la séquence bovine (Cong *et al.*, 1998b) suggérant un rôle régulateur pour ce domaine. L'homologie entre les séquences protéiques de calpastatine dans les différentes espèces n'est pas aussi importante que celle observée pour les calpaïnes mais présentent tout de même un pourcentage d'identité supérieur à 65 %. La séquence peptidique de la calpastatine est unique en ce sens qu'aucune homologie avec un autre polypeptide n'a été identifiée jusqu'à aujourd'hui. Aucune activité calpastatine ni aucune séquence de calpastatine n'ont pu être identifiées dans les invertébrés comme *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* ou *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2) Structure du gène codant la calpastatine (CAST)

Jusqu'en 2000, seules des structures partielles du gène codant la calpastatine, appelé *CAST*, étaient disponibles (Figure 5). Une étude a tout d'abord décrit le découpage des domaines L, I et de la partie N-terminale du domaine II, en 14 exons chez l'homme (Lee *et al.*, 1992b). Plus tard, quatre exons, numérotés de 1 à 4, correspondant à la séquence peptidique XL ont été décrits chez le bovin (Cong *et al.*, 1998b). En fait, l'exon 4 bovin correspondait à l'exon 2 humain précédemment décrit, l'exon 1 humain ne correspondant pas à l'exon numéroté 3 chez le bovin (Figure 5). En fait, c'est par la description de quatre transcrits différant par leur partie 5' (voir II. B. 3) que la première structure complète du gène *CAST* a été établie chez la souris (Takano *et al.*, 2000). Les auteurs décrivaient un gène découpé en 34 exons répartis sur au moins 60 kpb (Figure 5). Cependant, depuis le séquençage complet du génome murin, il apparaît dans les banques de données que les 34 exons sont répartis



**Figure 6. Structures des transcrits de Type I, II, III et IV murin de calpastatine.**

Les exons sont représentés par les boîtes bleues et leurs noms respectifs sont indiqués. Les étoiles rouges et jaunes indiquent les codons de démarrage de la traduction et le codon stop, respectivement. Les flèches noires représentent les sites de démarrage de la transcription.

sur plus de 113 kpb ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/evv.cgi?org=mouse&contig=NT\\_078713.2&gene=Cast&lid=12380](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/evv.cgi?org=mouse&contig=NT_078713.2&gene=Cast&lid=12380)). Cette différence de taille est probablement due aux introns murins qui n'avaient pas été séquencés entièrement, leur taille ayant été estimée par migration sur gel d'agarose. Par comparaison, il apparaît que les quatre exons de la structure partielle bovine correspondent en fait au 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> exons de la partie 5', nommés 1xb, 1y, 1z et 2 chez la souris. Pour ce qui concerne la structure partielle humaine, les exon 2 à 14 correspondent aux exons 2 à 14 de la structure murine. L'exon 1 humain correspondrait lui à l'exon 1u murin (Figure 5). Cependant, cet exon étant non traduit, on observe une faible conservation des séquences au travers des espèces. Un an après la structure murine, une structure partielle porcine allant de l'exon 1xa à 2 fut décrite (Figure 5 (Parr *et al.*, 2001)). Ces six exons sont répartis sur 60 kpb indiquant de grands introns en 5'. Malgré le séquençage du génome humain, la structure complète du gène *CAST* humain n'a jamais été publiée. Cependant, dans les banques de données, une structure comportant 32 exons répartis sur presque 80 kpb est disponible ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/evv.cgi?contig=NT\\_023148.12&gene=CAST&lid=831](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/evv.cgi?contig=NT_023148.12&gene=CAST&lid=831)). Par comparaison avec les données connues, cette structure humaine ne possède pas les exons 1xa, 1xb, 1y et 1z murins. Ceci semble être du à l'absence des transcrits possédant ces exons dans les banques de données. Toutes ces structures partielles ou complètes ont permis d'établir des correspondances entre les exons et les séquences protéiques. La traduction des exons 2 à 8 correspond au domaine L sur la protéine, les exons 9 à 13 au domaine I, de 14 à 18 au

domaine II, de 19 à 23 au domaine III et enfin de 24 à 29 au domaine IV (Goll *et al.*, 2003). Chacun des trois premiers domaines inhibiteurs (I, II et III) correspondent à la traduction de 5 exons alors que le domaine IV correspond à 6 exons. D'autre part, chacun des sous-domaines A, B et C est codé par un seul exon.

### 3) *Transcrits de calpastatine*

Depuis 15 ans, de nombreuses séquences d'ADNc ont été décrites chez l'homme (Asada *et al.*, 1989), la souris (Takano *et al.*, 1999), le rat (Ishida *et al.*, 1991), le porc (Takano *et al.*, 1988), le bovin (Cong *et al.*, 1998b; Killefer et Koohmaraie, 1994) et le lapin (Emori *et al.*, 1987). Beaucoup d'études ont relaté des phénomènes d'épissages alternatifs dans différentes lignées cellulaires humaines (Lee *et al.*, 1992a), dans le cerveau de rat (De Tullio *et al.*, 1998), dans le muscle squelettique murin (Takano *et al.*, 1999), le cœur et le muscle squelettique de porc (Geesink *et al.*, 1998; Parr *et al.*, 2001). Les épissages des exons 2 à 8 ainsi que celui de l'exon 12 ont été décrits, le plus répandu étant celui de l'exon 3. Initialement, seuls des transcrits ne comportant pas l'exon 3 avaient été décrits chez le rat, conduisant à l'hypothèse que l'exon 3 n'était pas présent chez les rongeurs (De Tullio *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1992a). Cependant cette hypothèse a été réfutée par la présence de l'exon 3 dans le gène murin et dans certains transcrits chez la souris (Takano *et al.*, 1999; Takano *et al.*, 2000). Tous ces transcrits ne comportaient qu'un seul codon de démarrage de la traduction (AUG). C'est en 1998, avec l'identification d'une nouvelle séquence peptidique (XL) qu'un nouvel AUG a été décrit en amont de celui présent dans l'exon 2 (Cong *et al.*, 1998b). Lors de cette étude, l'existence de trois transcrits dans le cœur bovin a été démontrée. Hormi, ce nouveau codon de démarrage de la traduction, trois régions 3' UTR (Untranslated Region) très différentes en tailles ont aussi été identifiées (Cong *et al.*, 1998b). En 2000, l'établissement de la structure du gène murin s'est accompagné de nouvelles données. Pour la première fois, quatre familles de transcrits qui diffèrent par leur partie 5' ont été identifiés (Li *et al.*, 2000; Takano *et al.*, 2000). Ces quatre types de transcrits sont nommés Type I, II, III et IV (Figure 6). Cette étude a conduit à l'identification de deux AUG supplémentaires compris dans les exons 1xa et 14t, les deux précédents étant inclus dans les exons 1xb et 2. Un seul codon stop est toujours observé, situé dans l'exon 29. Les transcrits de Type I, II et III ont été également observés chez le porc (Parr *et al.*, 2001). Les transcrits de Type I et II démarrent leur transcription au niveau des exons 1xa et 1xb, respectivement, incluant les exons 1y, 1z, 2...etc., et ils utilisent les codons de démarrage de la traduction présents respectivement dans les exon 1xa et

1xb (Figure 6). Le Type III débute sa transcription au niveau de l'exon 1u et utilise le codon AUG présent dans l'exon 2. Chacun des Type I, II et III épisse l'exon 14t. Le transcrit de type IV débute sa transcription au niveau de l'exon 14t et utilise le codon AUG présent dans ce même exon (Figure 6). L'étude des profils d'expression, chez la souris et le porc, révèle que les transcrits de Type I, II et III sont présents dans un certain nombre de tissus tels que le cœur, le muscle squelettique, le foie, le cerveau et les testicules, suggérant un mode d'expression ubiquitaire. Cependant, il semble qu'ils soient présents en quantités différentes. Récemment, une étude quantitative réalisée dans un muscle squelettique de porc a montré que le Type I et III était en quantité équivalente, le transcrit de Type II y étant en quantité bien inférieure (Parr *et al.*, 2004). Par ailleurs, une analyse des transcrits par « Northern blot », chez le porc, sur des ARNm de cœur et de muscle squelettique a montré un profil surprenant (Parr *et al.*, 2001). En effet, l'utilisation d'une sonde commune à tous les types de transcrits a montré un profil à deux bandes. Le même profil fut observé avec des sondes spécifiques de chacun des ARNm de Type I, II et III. Ces résultats suggèrent que les différences de tailles observées ne correspondraient pas aux différences observées dans la partie 5' mais plutôt dans la partie 3'. Enfin, le Type IV affiche une expression spécifique des testicules. Cette expression spécifique a été démontrée par RT-PCR (Takano *et al.*, 2000) ainsi que par criblage d'une banque d'ADNc testiculaire (Li *et al.*, 2000). Cette expression semblerait même être cantonnée aux spermatides dans les testicules (Li et Goldberg, 2000; Wei *et al.*, 1995). Toutes ces données suggèrent de multiples régulations tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau de la maturation des pré-ARNm.

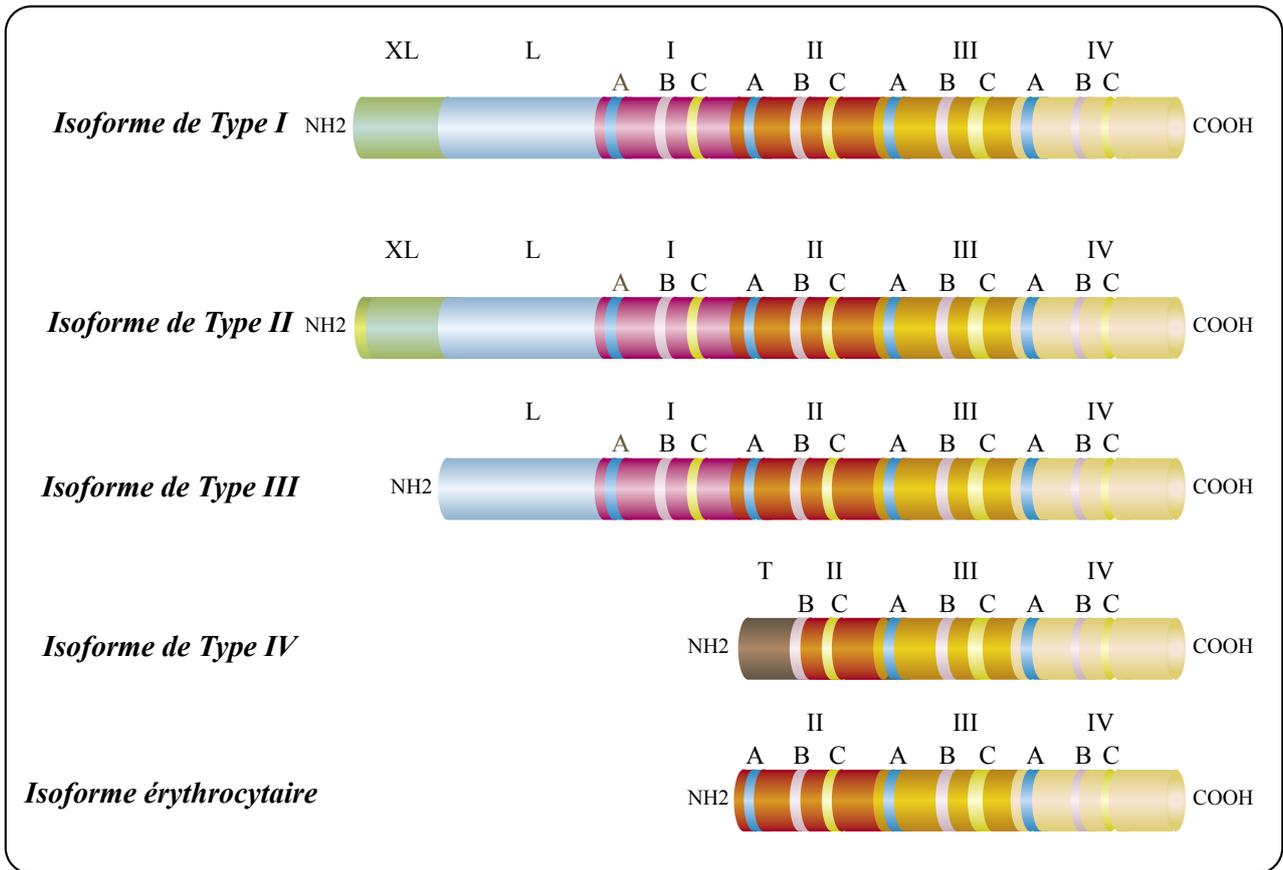
#### **4) Régulation transcriptionnelle de CAST**

L'étude de la région en amont de l'exon 1xb, par transfections transitoires dans une lignée cellulaire a été réalisée en 1998 (Cong *et al.*, 1998b). Elle démontrait que les 272 nucléotides en amont du site de démarrage de la transcription sont suffisants pour obtenir une expression du gène rapporteur et donc une activité promotrice, les autres séquences en amont activant ou inhibant cette activité transcriptionnelle. Une augmentation de l'activité promotrice de 7 à 20 fois était observée en présence de dibutyryl AMPc, un activateur constitutif de la voie de signalisation à l'AMPc. Ceci est corrélé avec la présence de séquences importantes pour la réponse à l'AMPc. Une étude plus approfondie de cette région a notamment permis d'identifier un élément *in cis*, en position -76, contrôlant la réponse à l'AMPc (Cong *et al.*, 1998a). C'est lors de la découverte des quatre familles

de transcrits chez la souris que l'existence de plusieurs promoteurs dans le gène *CAST* a été évoquée (Takano *et al.*, 2000). Récemment, les régions en amont des exons 1xa, 1xb et 1u de porc ont été étudiées (Parr *et al.*, 2004). Cette analyse a montré que ces trois régions sont promotrices. La délétion d'un îlot CpG dans la partie proximale de la région en amont de l'exon 1u entraîne une quasi complète perte d'activité transcriptionnelle. Enfin, la délétion d'un microsatellite, de répétition CA, présent dans la région en amont de l'exon 1xa conduit, quant à elle, à une augmentation significative de l'activité promotrice. Considérant ces nouvelles données, il apparaît maintenant que l'étude des régions promotrices, réalisée chez le bovin, incluait en fait deux régions promotrices (en amont de l'exon 1xa et 1xb) (Cong *et al.*, 1998b). Enfin, le promoteur dirigeant l'expression tissu-spécifique du transcrit de Type IV a été identifié par la construction de souris transgéniques (Li et Goldberg, 2000). Ces souris portent une construction, comprenant la séquence entre l'exon 14 et 14t murin en amont d'un gène rapporteur. L'expression du gène rapporteur a été détectée uniquement dans les testicules et plus particulièrement dans les cellules au stade spermatide, démontrant la spécificité tissulaire du promoteur dirigeant l'expression du transcrit de Type IV. Pour résumer, il semblerait que le gène *CAST* présente plusieurs promoteurs dont un tissu-spécifique.

### **5) Isoformes protéiques de calpastatine**

Les premières études ont montré que la calpastatine était résistante à de hautes températures (jusqu'à 100°C) ainsi qu'à une grande variété d'agents dénaturants tels que l'urée, le SDS (sodium dodécyl sulfate) ou encore le TCA (acide trichloroacétique) (Geesink *et al.*, 1998; Otsuka et Goll, 1987). Les premières tentatives de purification de cette protéine ont donné des résultats très variables, révélant des masses moléculaires allant de 34 à 280-300 kDa (Goll *et al.*, 2003). Un grand nombre de facteurs semble avoir participé à ces inconsistances. Tout d'abord, la calpastatine est sujette à protéolyse (Otsuka et Goll, 1987). C'est pourquoi, lors d'extractions protéiques, il est important d'utiliser des cocktails d'inhibiteurs de protéases ainsi que de faire bouillir les échantillons pour altérer les protéases elles-mêmes (Geesink *et al.*, 1998). Ensuite, une surestimation de la masse moléculaire lors des nombreuses analyses par chromatographie d'exclusion n'est pas à écarter, sachant aujourd'hui que la conformation de la calpastatine n'est pas sphérique (Konno *et al.*, 1997). Enfin, il a été montré que la calpastatine migre anormalement lentement en gel SDS-PAGE. Par exemple, il a été mis en évidence qu'une isoforme, de séquence connue et de masse calculée à 77 kDa, migre sur un gel SDS-PAGE à hauteur de 100 kDa (Takano *et al.*, 1988). Il est avéré que cette



**Figure 7. Structures des isoformes protéiques de calpastatine.**

Les structures des isoformes protéiques déduites des séquences des transcrits de Type I, II, III et IV ainsi que celle de la forme érythrocytaire sont présentées. Les domaines XL, L, I, II, III, IV et T sont représentés en vert, bleu, rose, rouge, orange, beige et marron, respectivement. Les sous-domaines A, B et C sont en bleu, rose et jaune, respectivement. Les séquences en N-terminal de la séquence XL de l'isoforme de Type I et II sont issues respectivement de la traduction des exon 1xa et 1xb et sont donc différentes. Ceci est indiqué par du vert clair pour l'isoforme de Type II.

migration anormale n'est due ni à des modifications post-traductionnelles, ni à un phénomène de dimérisation de la protéine (Otsuka et Goll, 1987). L'utilisation de promoteurs différents ainsi que les phénomènes d'épissages alternatifs conduisent à la formation de très nombreuses isoformes protéiques de calpastatine. Effectivement, au cours des dix dernières années, des isoformes de masses variées ont pu être identifiées notamment par la technique de western blot. Cependant, il est difficile d'attribuer une forme observée à un transcrite particulier ou à un produit de protéolyse, à cause de la migration anormalement lente de cette protéine. De plus, ces isoformes ne sont généralement pas tissus-spécifiques et plusieurs formes de tailles assez identiques peuvent être retrouvées dans différents tissus. L'existence de quatre familles de transcrits ayant été démontrée, il peut être imaginé qu'au moins quatre familles de protéines peuvent être observées (Figure 7), si chaque famille de transcrite est traduite. Il a d'ores et déjà été montré que les formes de Type I et/ou II migrent à 145 kDa sur SDS-PAGE grâce, chez le bovin, à un anticorps spécifique du domaine XL (Cong *et al.*, 1998b) et, chez le porc, à un anticorps spécifique de la forme de Type I (Parr *et al.*, 2004). Précédemment, la forme de type I était supposée comme migrant à 172 kDa mais sans l'utilisation d'anticorps spécifiques (Goll *et al.*, 2003). Une forme spécifique, observée seulement dans les érythrocytes, migre à 70 kDa (Figure 7). La partie N-terminale de cette forme a été séquencée et correspond aux acides aminés présents au tout début du domaine II juste après une méthionine (Imajoh *et al.*, 1987). Cette forme correspondrait donc à un produit d'une initiation tardive de la traduction. Pour les autres isoformes observées, seules des hypothèses sont faites en l'absence de l'utilisation d'anticorps spécifiques. Des formes à 135 et 125 kDa sont également observées, elles sont généralement attribuées à la forme de Type III avec ou sans l'exon 3, respectivement (Geesink *et al.*, 1998; Goll *et al.*, 2003). De même, des formes de 100-110 kDa sont rapportées comme correspondant soit à une protéine de Type III ne possédant ni l'exon 3, ni l'exon 6 (Goll *et al.*, 2003), soit à un produit de protéolyse (Cong *et al.*, 1998b). Enfin, aucun extrait protéique testiculaire n'ayant été étudié, aucune hypothèse concernant la protéine de Type IV n'a été formulée. L'étude des séquences du transcrite de Type IV a permis la prédiction d'une protéine de type IV à 4 domaines (Figure 7). Les domaines III, IV et seulement la partie C-terminale du domaine II (absence du sous-domaine A) des formes de Type I, II et III sont conservés. Un domaine supplémentaire, le domaine T, correspondant à la traduction de l'exon 14t, a été identifié. La mutation d'un site de myristylation, au sein du domaine T abolit l'association aux membranes de la protéine de Type IV. Cette isoforme protéique pourrait moduler l'activité des calpaïnes lors de la réaction acromosomiale qui est calcium dépendante et qui est requise pour la fécondation (Li et Goldberg, 2000; Li *et al.*, 2000). Pour résumer, d'après les

différents transcrits décrits, de nombreuses isoformes protéiques peuvent être prédites, et plusieurs formes sont observées en SDS-PAGE. Mais, aujourd'hui, l'établissement d'une correspondance entre les divers types d'ARNm existants et les produits de traduction décrits reste difficile.

### **6) Phosphorylation de la calpastatine**

Plusieurs sites de phosphorylation à la PKA ont été mis en évidence dans le domaine XL bovin. Ces sites peuvent être phosphorylés *in vitro* par une PKA purifiée (Cong *et al.*, 1998b) et ils sont également présents chez l'homme et la souris alors qu'ils sont absents de la séquence peptidique de porc. Pour autant, l'effet de cette phosphorylation du domaine XL n'a, pour le moment, pas été étudiée, mais les auteurs suggèrent un rôle régulateur de cette séquence peptidique. Il a également été démontré que la calpastatine peut-être phosphorylée *in vitro* par la PKA (Salamino *et al.*, 1994) et *in vivo* par la PKA et la PKC (Adachi *et al.*, 1991; Salamino *et al.*, 1994). Ces phosphorylations semblent avoir peu d'effet sur les propriétés inhibitrices de la calpastatine. Par contre, la phosphorylation *in vivo* par la PKA ou la PKC augmente la quantité de calpastatine associée à la membrane (Adachi *et al.*, 1991). Etant donné que la signification de l'association entre la calpastatine et la membrane plasmique est encore inconnue, il est difficile de déterminer exactement le rôle de cette phosphorylation. En revanche, on sait que la calpastatine associée aux membranes est aussi efficace que celle présente dans le cytosol pour inhiber les calpaïnes (Mellgren *et al.*, 1987). Au contraire, une étude sur la calpastatine de rat démontre une phosphorylation *in vitro* par la PKA ou la PKC entraînant une diminution de l'efficacité d'inhibition de la  $\mu$ - et de la m-calpaïne (Averna *et al.*, 1999; Salamino *et al.*, 1994). Cependant, les acides aminés décrits comme étant phosphorylés ne sont pas conservés dans toutes les espèces. Les effets de la phosphorylation décrits dans ces études ne reflèteraient donc pas un mécanisme général de régulation de la calpastatine. En résumé, il semble clair que la calpastatine est phosphorylée *in vitro* et *in vivo* par la PKA ou la PKC, mais les effets de cette phosphorylation restent incertains.

### **C. Autres membres de la familles des calpaïnes**

Durant les 15 dernières années, le clonage et le séquençage des génomes ont permis l'identification de nombreux gènes « calpain-like » dans différents organismes ou dans des tissus spécifiques. Peu de choses sont connues concernant les propriétés catalytiques des protéines issues de ces gènes. L'appartenance à la famille des calpaïnes ainsi que la nomenclature ne sont pour le

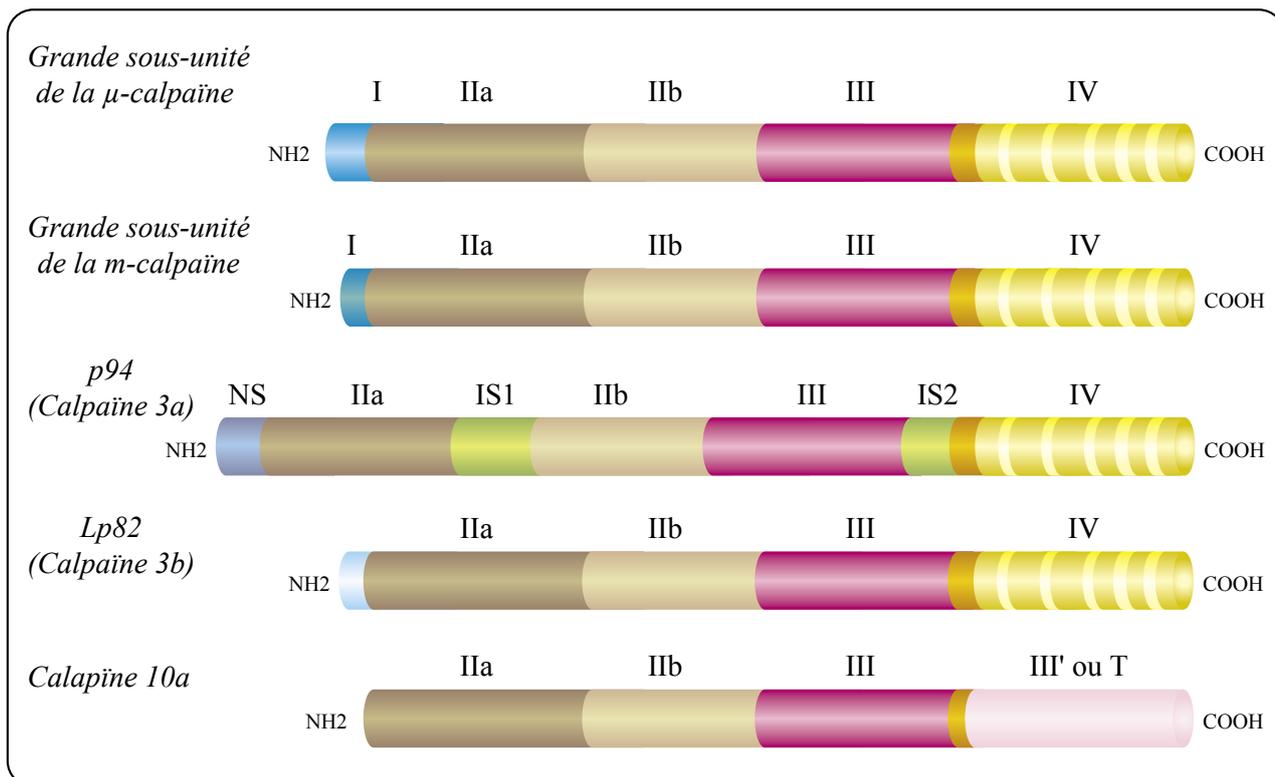
moment pas clairement établies. Dans les paragraphes suivants, je ferais référence à la revue de Goll *et al.*, 2003. Les séquences considérées comme « calpain-like » doivent présenter plus de 25 % d'identité avec le domaine II des calpaines classiques. Celles présentant une structure similaire à la grande sous-unité de la  $\mu$ - et la m-calpaïne, notamment par la présence de séquences « EF-hand » dans le domaine IV, sont classées en calpaines dites « typiques ». Les autres sont classées dans les calpaines dites « atypiques ». En 2003, 11 calpaines « typiques » (8 chez les vertébrés, et 3 chez *Drosophila*) et 27 « atypiques » étaient recensées. Dans cette partie, quelques caractéristiques des calpaines 3 et 10 vont être exposées, étant donné leur implication dans certaines pathologies qui seront évoqués plus largement dans le paragraphe III.B. Quelques données concernant les « calpaïne-like » des plantes seront également présentées.

### 1) Les calpaines 3a (p94) et 3b (Lp82)

Les calpaines 3a et 3b sont issues de la traduction des transcrits alternatifs du gène *Capn3*.

#### a) La calpaïne 3a (p94)

Cette calpaïne est de loin la plus étudiée des molécules « calpain-like » du fait de son implication dans la dystrophie des ceintures de type 2A (voir partie sur les implications pathologiques des calpaines, III. B. 1.). Il a été rapporté que le gène *Capn3* humain comporte 24 exons répartis sur environ 40 kpb (Richard *et al.*, 1995). La calpaïne 3a comporte 821 acides aminés ayant 54 et 51 % d'homologie avec la  $\mu$ - et la m-calpaïne respectivement. La calpaïne 3a a une masse plus importante (94 kDa) que les calpaines ubiquitaires du fait de la présence, d'une part, d'un domaine supplémentaire de 20-30 résidus dans la partie N-terminale (NS) et, d'autre part, de deux insertions (IS1 et IS2) de 62 et 77 acides aminés, dans les domaines II et III respectivement (Figure 8) (Sorimachi *et al.*, 1989). Une analyse par Northern blot a, tout d'abord, montré une expression spécifique du muscle squelettique (Sorimachi *et al.*, 1989), mais une étude par RT-PCR, plus sensible, a aussi montré une expression, plus faible, dans le cœur et le foie (Poussard *et al.*, 1996). Les propriétés de la calpaïne 3a restent très floues. En effet, dans le muscle squelettique, 10 fois plus d'ARNm de calpaïne 3a que d'ARNm de la grande sous-unité de la  $\mu$ - et de la m-calpaïne sont présents (Sorimachi *et al.*, 1989), et pourtant il semble impossible d'isoler la protéine à partir de muscle. Les tentatives pour isoler la calpaïne 3a ont mis en évidence des peptides de 60, 58, 55 et 31 kDa au lieu de 94 kDa. Ces fragments semblent résulter d'une autolyse dans la région IS1 (Kinbara *et al.*,



**Figure 8. Structures protéiques des calpaines 3a, 3b et 10a.**

Les domaines ayant une structure similaire sont représentés par les mêmes couleurs et leurs noms sont indiqués. Le domaine de liaison entre les domaines III et IV est indiqué en orange. Les motifs « EF-hand » sont représentés en jaune dans le domaine IV (d'après (Suzuki *et al.*, 2004)).

1998). La délétion de IS2 résulte en un polypeptide stable dans des cellules transfectées, alors que lorsque cette séquence est présente, la demi-vie de la calpaïne 3a est d'environ 30 min (Sorimachi *et al.*, 1993). Il semblerait donc que les deux insertions, IS1 et IS2, soient impliquées dans la stabilité de la protéine. Des expériences de double-hybride chez la levure n'ont pas permis de détecter une quelconque interaction avec la petite sous-unité de 28 kDa.

### *b) La calpaïne 3b (Lp82)*

Lp82 est issue d'un épissage alternatif du gène *Capn3*. Ce variant alternatif ne comprend pas les exons 6, 15 et 16 et utilise un exon 1 différent. Ceci conduit à un domaine N-terminal différent et à la suppression des séquences uniques de la calpaïne 3a (Figure 8 ; NS, IS1 et IS2). Ce variant est exclusivement trouvé dans les yeux chez différents animaux mais pas chez l'homme (Ma *et al.*, 1998a; Nakamura *et al.*, 2000). Lp82 est la seule, mis à part les calpaïnes ubiquitaires, à avoir été isolée. Elle a été partiellement purifiée à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions donnant une protéine de 82 kDa sur SDS-PAGE concordant avec sa masse calculée. Cette protéine présente une activité protéolytique envers la caséine en présence de calcium (Ma *et al.*, 1998b), cette activité ne nécessitant pas une autre sous-unité telle que la sous-unité de 28 kDa. Enfin, elle est peu inhibée par la calpastatine mais l'est par des inhibiteurs synthétiques de cystéines protéases tels que E-64 (Nakamura *et al.*, 1999). Il est à noter que, contrairement à la p94, Lp82 est stable. Cette différence est probablement due à l'absence principalement des séquences IS1 et IS2, unique à la p94. Pour finir, la calpaïne 3b semble être impliquée dans la cataracte chez le rat, et ce point sera développé dans la partie III. B. 4.

## **2) La calpaïne 10**

La calpaïne 10 est de plus en plus étudiée en raison de la relation établie entre cette protéine et le diabète de type 2 (voir III. B. 2.). Le gène humain *Capn10* codant cette protéine, localisé sur le chromosome 2, comporte 15 exons répartis sur 31 kpb (Horikawa *et al.*, 2000). Ce gène montre un profil d'expression complexe avec 8 variants alternatifs identifiés, nommés de a à h. L'expression du gène *Capn10* semble ubiquitaire et le transcrit 10a est le plus répandu et le plus abondant (Horikawa *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2001). Actuellement, la signification de tous ces transcrits et des isoformes correspondantes n'est pas connue. L'utilisation d'un anticorps, dirigé contre 20 acides aminés du domaine II, a permis la détection d'un doublet autour de 75 kDa dans certains tissus exprimant des transcrits de la calpaïne 10 (Ma *et al.*, 2001). La calpaïne 10a est une calpaïne « atypique » de 672 acides

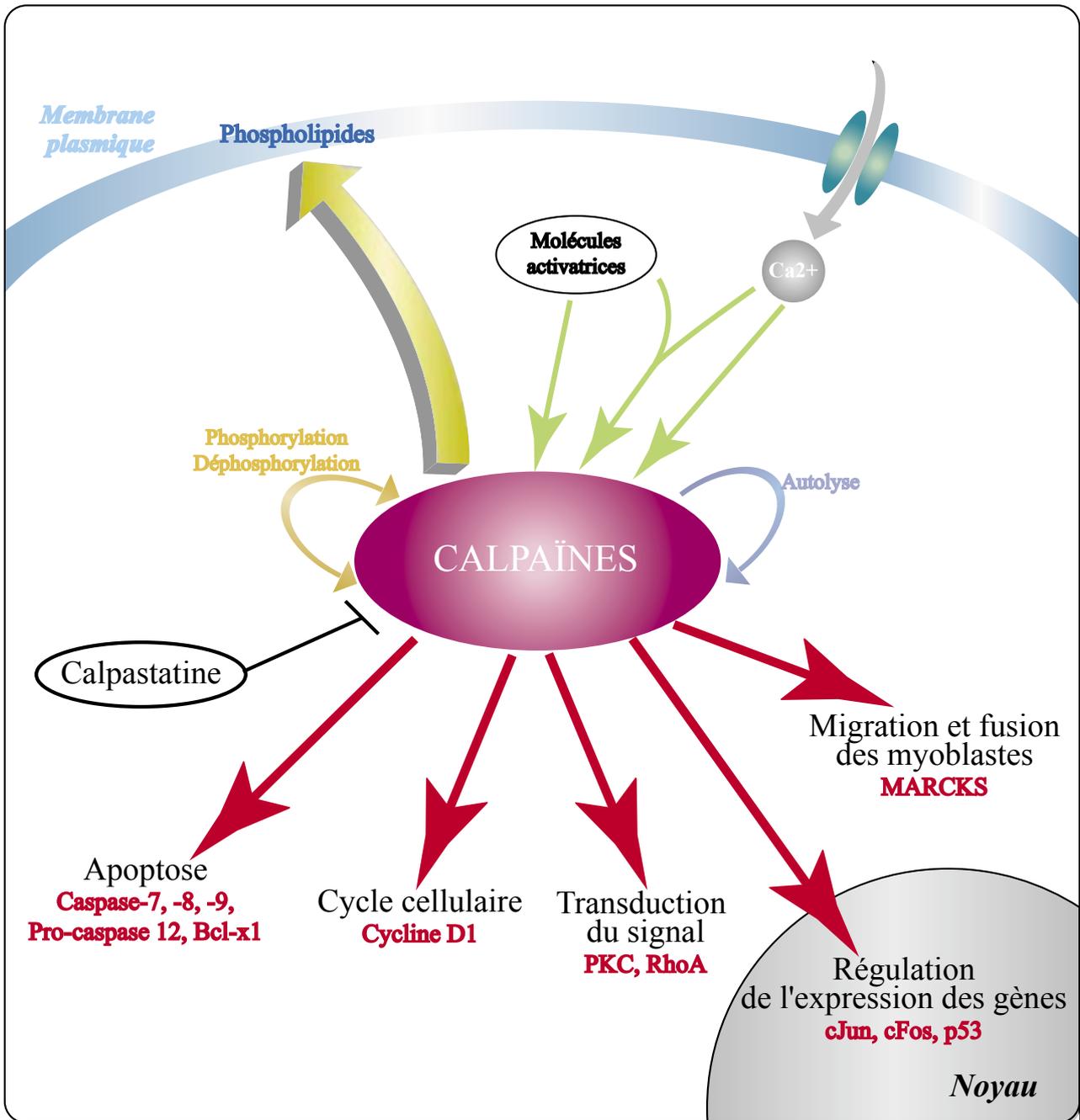
aminés possédant un domaine T qui ressemble au domaine III d'un point de vue phylogénique et structurel, à la place du domaine IV des calpaïnes classiques (Figure 8). Ce type de structure n'est pas unique parmi les calpaïnes « atypiques », elle est également retrouvée dans les calpaïnes 5 et 6. Quelques acides aminés du domaine II, très conservés dans un grand nombre de calpaïnes, placés autour de la triade catalytique, sont différents dans la calpaïne 10 (Branca, 2004). Même s'il a été montré qu'une augmentation de calcium dans certaines cellules entraîne une surexpression de *Capn10* (Ma *et al.*, 2001), les résidus responsables de la fixation du calcium dans le domaine II et III ne sont pas retrouvés dans la calpaïne 10. Enfin, il est à noter que pour le moment aucune activité protéolytique n'a été détectée. Pour toutes ces raisons, il semble raisonnable de penser que l'activité de la calpaïne 10 implique des mécanismes moléculaires différents de ceux des calpaïnes typiques.

### **3) Les « calpain-like » chez les plantes**

Récemment les efforts de séquençage ont permis l'identification de gènes « calpain-like » notamment chez *Arabidopsis thaliana* ou *Zea mays* (Lid *et al.*, 2002; Theologis *et al.*, 2000). Chez le maïs, le produit du gène *dek1* (DEK1 : defective kernel 1) est une protéine à 7 domaines, nommés A, B1, B2, C, D, II et III. Le domaine A présente un peptide signal pour le réticulum endoplasmique et la membrane. Les domaines B1 et B2 possèdent 8 et 13 sous-domaines transmembranaires, respectivement. Le domaine C de 300 acides aminés compris entre B1 et B2 est extracellulaire. Le domaine D, quant à lui, est hydrophile et intracellulaire. Enfin, les domaines II et III présentent une forte homologie avec les domaines IIa/IIb et III des calpaïnes ubiquitaires (Lid *et al.*, 2002). Il est à noter qu'aucun domaine IV avec des séquences « EF-hand » n'est présent, classant cette protéine parmi les calpaïnes « atypiques ». Toutes les plantes dont le génome a été entièrement, ou pour partie, séquencé présentent une seule copie d'un gène codant pour une « calpaïne » transmembranaire. Le problème est qu'aucune protéine identifiée comme faisant partie de la famille des calpaïnes n'a été isolée à partir de tissus. A l'inverse, quelques protéases dépendantes du calcium, pour lesquelles aucune donnée de séquence n'est disponible, ont pu être isolées notamment chez *Arabidopsis thaliana*. Ces protéases ne sont reconnues par aucun des cinq anticorps anti-calpaïne testés (Safadi *et al.*, 1997). De plus, elles sont plus fortement inhibées par la pepstatine que par E-64 (Reddy *et al.*, 1994), alors que la pepstatine n'a aucun effet sur les calpaïnes ubiquitaires. Il est donc difficile de déterminer sans leurs séquences si elles appartiennent à la famille des calpaïnes. De nouvelles études restent donc nécessaires pour déterminer dans quelle mesure il existerait chez les plantes des protéases ayant une activité similaire à celle des calpaïnes ubiquitaires.

## II. Régulation et fonctionnement du système calpaïnes/calpastatine

Il peut être estimé que tous les disques Z au niveau du muscle squelettique seraient dégradés en moins de 5 min si toutes les molécules de calpaïnes, décrites comme étant localisées au niveau des disques Z, étaient actives. Il semble donc évident que la majorité des molécules de calpaïnes est inactive la plupart du temps dans une cellule. Malgré les nombreuses études menées sur les mécanismes de régulation de l'activité protéolytique des calpaïnes, les conditions exactes sous lesquelles ces protéases sont actives sont encore méconnues. Il semble évident qu'il existe plusieurs mécanismes de régulation du fait du nombre de substrats potentiels et du fait de leur protéolyse spécifique (à un moment donné et à des sites précis). De nombreux phénomènes tels que l'autolyse, une localisation subcellulaire particulière, l'inhibition par la calpastatine, la phosphorylation et la fixation aux membranes ont été impliqués dans la régulation de l'activité des calpaïnes (Figure 9). Même si les rôles exacts de chacun de ces points de régulation sont méconnus et il n'est pas exclu d'imaginer que plusieurs de ces mécanismes agissent selon différentes combinaisons pour activer les calpaïnes spécifiquement dans un type cellulaire en réponse à un stimulus particulier. Dans cette partie, nous décrirons individuellement certains des mécanismes ayant été impliqués dans la régulation et le fonctionnement du système calpaïnes/calpastatine.



**Figure 9. Régulation et fonctionnement des calpaïnes**

Sur cette figure, les mécanismes de régulation ainsi que les sites d'action des calpaïnes dans la cellule sont schématisés. Les flèches grises, jaunes, orange, bleue, vertes, noires et rouges représentent le flux de calcium, le relocalisation des calpaïnes aux membranes, la phosphorylation/déphosphorylation, l'autolyse, l'activation, l'inhibition par la calpastatine et l'activité protéolytique, respectivement.

## A. Localisation cellulaire

Les calpaïnes ubiquitaires ainsi que la calpastatine ont jusqu'alors été détectées dans tous les tissus et les cellules testées. Cependant, le ratio de ces trois protéines diffère dans un type cellulaire donné. Par exemple, aucune molécule de m-calpaïne n'est détectée dans les plaquettes et les érythrocytes humains alors qu'aucune molécule de  $\mu$ -calpaïne n'a pu être mise en évidence dans les plaquettes bovines (Taylor *et al.*, 1991). En général, on détecte autant de  $\mu$ - que de m-calpaïne alors que la calpastatine est présente en excès. Dans un grand nombre de cellules et de tissus, il a été observé que l'activité calpastatine excédait l'activité des deux calpaïnes ensemble (Goll *et al.*, 2003). De nombreuses études d'immunolocalisation ont montré que les trois acteurs principaux du système calpaïnes/calpastatine sont exclusivement présents à l'intérieur de la cellule. Le peu d'étude, ayant fait état d'une localisation extracellulaire, ont été rapportées comme artéfactuelles (Kumamoto *et al.*, 1992). La plupart des études montre que la  $\mu$ -, la m- calpaïne et la calpastatine sont co-localisées dans la cellule (Goll *et al.*, 1992; Kumamoto *et al.*, 1992), comme par exemple au niveau du disque Z dans les muscles squelettique et cardiaque (Kumamoto *et al.*, 1992; Lane *et al.*, 1985). Une localisation membranaire a pu également être mise en évidence, notamment pour la m-calpaïne dans des myoblastes en division (Schollmeyer, 1986a) et en fusion (Schollmeyer, 1986b). Ce type d'étude a conduit à l'hypothèse que les calpaïnes passeraient d'une distribution homogène dans la cellule à une localisation ciblée en réponse à des signaux cellulaires engendrant éventuellement un flux de calcium. En effet, une étude récente, appuyant cette hypothèse, montre une répartition globalement homogène de la calpastatine ainsi que des grande et petite sous-unités de la  $\mu$ -calpaïne dans deux types cellulaires non stimulés. Après stimulation avec la ionomycine, provoquant un accroissement du taux de calcium intracellulaire, les sous-unités de la  $\mu$ -calpaïne sont retrouvées principalement au niveau de la membrane plasmique alors que la répartition de la calpastatine reste inchangée. Dans cette même étude, il a été également démontré que le domaine III était essentiel à la migration des calpaïnes vers les membranes et que deux hélices  $\alpha$  dans la partie N-terminale de la grande sous-unité dirigeraient une localisation nucléaire (Gil-Parrado *et al.*, 2003). Il semblerait qu'une redistribution sub-cellulaire des calpaïnes et/ou de la calpastatine pourrait représenter un mécanisme de régulation spécifique de l'activité de ces protéases, en réponse à des stimuli particuliers.

## B. L'autolyse

L'autolyse de la m-calpaïne en présence de calcium a été mise en évidence pour la première fois en 1981 (Suzuki *et al.*, 1981a; Suzuki *et al.*, 1981b). Il est connu aujourd'hui que la  $\mu$ - et la m-calpaïne subissent une autolyse lorsqu'elles sont incubées en présence de calcium (Cong *et al.*, 1989; Edmunds *et al.*, 1991). Une autolyse rapide (moins de 2-3 min) est observée à 25°C et en présence d'au moins 1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette autolyse entraîne une baisse de la concentration en calcium nécessaire à l'activité maximale des calpaïnes, sans affecter leur spécificité d'action (Edmunds *et al.*, 1991). Cette concentration en calcium ainsi que celle requise pour l'autolyse restent supérieures à celle observée dans les cellules *in vivo*. L'autolyse intervient en plusieurs étapes. En ce qui concerne la grande sous-unité de la  $\mu$ -calpaïne, les 18 premiers résidus en N-terminal sont enlevés, suivis des 12 acides aminés suivants, conduisant à la formation successive d'une sous-unité de 78 puis 76 kDa (Zimmerman et Schlaepfer, 1991). Neuf puis dix résidus de l'extrémité N-terminale de la grande sous-unité de la m-calpaïne sont successivement enlevés conduisant à une protéine de 78 kDa (Brown et Crawford, 1993). Enfin, 26 puis 37 puis 28 résidus du domaine V de la petite sous-unité sont enlevés conduisant successivement à la formation d'une protéine de 26-27, 22-23 et 18 kDa ainsi qu'à la perte du domaine V riche en résidus glycine (Mccelland *et al.*, 1989). L'autolyse étant similaire mais pas strictement identique chez d'autres espèces, les nombres d'acides aminés mentionnés sont valables pour les protéines humaines. La signification du point de vue physiologique et/ou du point de vue de la régulation des calpaïnes reste controversée. En effet, étant donné que la concentration en calcium requise pour l'autolyse est très proche de celle requise pour l'activité protéolytique, les tests d'activité *in vitro* sont souvent accompagnés d'une autolyse. C'est d'ailleurs pour cette raison que les calpaïnes ont été longtemps considérées comme des proenzymes nécessitant l'autolyse pour être actives. En fait, de nombreux membres de la famille des cystéines protéases sont des proenzymes nécessitant l'autolyse d'un polypeptide bloquant l'accès au site actif. Cependant, de nombreuses études ont montré que la  $\mu$ - et la m-calpaïne étaient actives même sans avoir été autolysées (Cong *et al.*, 1989; Goll *et al.*, 1992; Mccelland *et al.*, 1989). La mutation du site de clivage prévient l'autolyse de la m-calpaïne et la forme non lysée est active (Elce *et al.*, 1997b). L'oxydation de la  $\mu$ -calpaïne par deux agents différents entraîne une perte d'activité mais ne prévient pas l'autolyse (Guttmann *et al.*, 1997). Enfin, la structure cristallographique de la m-calpaïne a montré que l'autolyse supprime une hélice  $\alpha$  en N-terminal de la grande sous-unité qui ne bloque pas le site actif (Hosfield *et al.*, 1999; Strobl *et al.*, 2000). La partie N-terminale de

la petite sous-unité, qui est ôtée lors de l'autolyse, n'est pas visible par modélisation aux rayons X, mais si cette région de la protéine bloquait le site actif, alors la diffraction aux rayons X aurait été suffisante pour que le domaine V soit détecté. Pour toutes ces raisons, les calpaïnes ne sont pas des proenzymes. La structure cristallographique a montrée que les domaines sujets à autolyse, I et V, interagissaient. Par conséquent, l'autolyse conduirait à un changement de conformation et/ou à une déstabilisation de l'hétérodimère (Hosfield *et al.*, 1999; Strobl *et al.*, 2000).

### C. La question du calcium

Deux questions majeures vis-à-vis du calcium se posent : combien de molécules de  $\text{Ca}^{2+}$  se fixent sur les calpaïnes et comment les calpaïnes peuvent-elles être actives dans la cellule puisque la concentration requise pour l'activité protéolytique est très supérieure à celle rencontrée dans les cellules vivantes.

Les nombreuses tentatives pour déterminer le nombre d'ions calcium se fixant sur les calpaïnes se sont heurtées à diverses difficultés techniques. L'une de ces difficultés est l'autolyse subie par les calpaïnes en présence de calcium. Afin de palier à ce problème, certains domaines des calpaïnes comme les domaines IV et VI, ont été produits dans des systèmes d'expression et étudiés pour leur capacité à fixer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Minami *et al.*, 1987). D'autres équipes ont choisi d'étudier la fixation du calcium par cristallographie au rayons X de différentes protéines mutées au niveau d'un ou plusieurs des motifs « EF-hand », sensés fixer le calcium (Dutt *et al.*, 2000). Cependant, toutes les études effectuées montrent de grandes différences dans les résultats obtenus tant au niveau des domaines fixant le calcium, qu'au niveau du nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  fixé par une molécule de calpaïne. Globalement, il semblerait que la m-calpaïne fixe plus d'atomes de  $\text{Ca}^{2+}$  que la  $\mu$ -calpaïne (Goll *et al.*, 2003), ceci concorde avec le fait que l'activité protéolytique de la m-calpaïne nécessite une plus grande concentration en calcium que celle de la  $\mu$ -calpaïne. Il semblerait que les motifs EF-5 et EF-5' ne fixent pas le calcium puisqu'ils sont responsables de l'association entre la petite et la grande sous-unité dans les calpaïnes. Les motifs EF-4 et EF-4' ne fixent pas ou peu le calcium. Enfin, les motifs « EF-hand » 1 à 3 et 1' à 3' fixeraient le calcium. En tout cas, il semblerait qu'il y ait, pour la fixation du calcium, une certaine coopération entre les différents motifs « EF-hand » et que la fixation d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  sur l'un de ces sites soit suffisante pour initier l'activité protéolytique (Dutt *et al.*, 2000). En outre, deux sites supplémentaires de fixation du calcium ont été mis en évidence dans les domaines IIa et IIb de la  $\mu$ -calpaïne. Ces sites ne sont pas des motifs « EF-hand » mais des

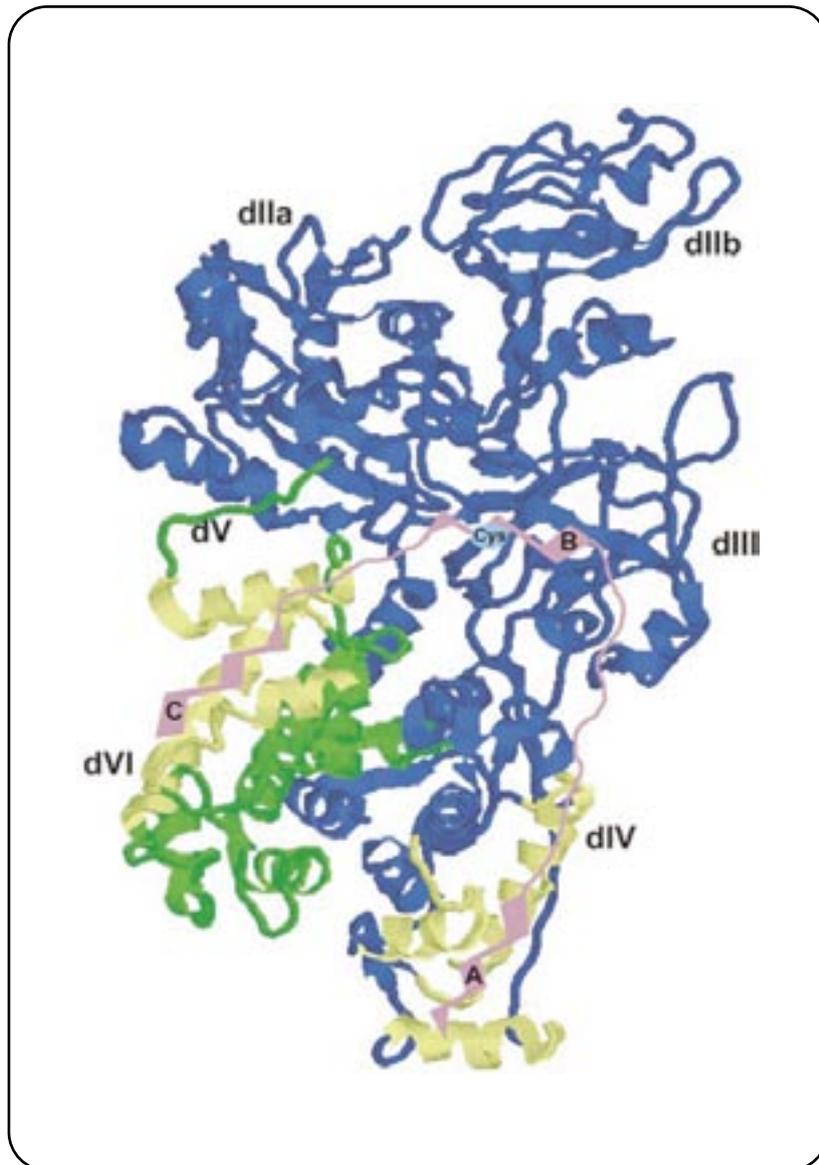
boucles peptidiques (Moldoveanu *et al.*, 2002). Enfin, la substitution de différentes parties de la m-calpaïne par les parties équivalentes de la  $\mu$ -calpaïne a permis de montrer que, la concentration en calcium requise pour l'activité protéolytique des calpaïnes est régulée par la molécule complète de calpaïne et non uniquement par les sites fixant le calcium (Dutt *et al.*, 2002). Ceci impliquerait que la conformation de la protéine interviendrait dans la sensibilité de la  $\mu$ - et de la m-calpaïne au calcium.

Etant donné que la concentration requise pour l'activité protéolytique des calpaïnes est très supérieure à celle observée dans les cellules vivantes, de nombreuses études pour identifier un mécanisme permettant de réduire la concentration requise en calcium ont été conduites. Il a été démontré que les phospholipides, tels que les PI (phosphatidylinositol) et les PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), diminueraient la quantité de calcium requise pour l'autolyse de la  $\mu$ - et la m-calpaïne (Carafoli et Molinari, 1998; Cong *et al.*, 1989; Coolican et Hathaway, 1984; Saido *et al.*, 1992). D'une part, ce type d'étude suppose qu'une fois autolysées les calpaïnes peuvent être actives aux concentrations cellulaires. D'autre part, la quantité de phospholipides minimale requise pour obtenir un tel effet est beaucoup trop importante pour exister dans la cellule (ratio molaire compris entre 375 et 4100 pour une molécule de calpaïne). Même si le rôle des phospholipides n'est pas de diminuer la concentration requise en calcium pour l'activité des calpaïnes, il semble que leur rôle soit important pour la fixation des calpaïnes aux membranes. De nombreuses molécules ou protéines, dites activatrices, ont été décrites comme permettant une diminution de la concentration en calcium requise (Melloni *et al.*, 1998; Melloni *et al.*, 2000; Pontremoli *et al.*, 1988; Pontremoli *et al.*, 1990a; Pontremoli *et al.*, 1990b). Le rôle de ces molécules ou protéines est encore incertain et la quantité nécessaire pour obtenir une diminution de la concentration en calcium requise est souvent assez élevée. Des molécules dites activatrices pourraient donc réguler l'activité des calpaïnes notamment en baissant la concentration en calcium requise pour l'activité protéolytique.

#### **D. L'inhibition des calpaïnes par la calpastatine**

Très tôt, il a été déterminé que la fixation de la calpastatine aux calpaïnes nécessitait du Ca<sup>2+</sup>, était réversible et que l'activité protéolytique des calpaïnes pouvait être récupérée par ajout d'un chélateur (Imajoh et Suzuki, 1985; Otsuka et Goll, 1987). La concentration requise en calcium pour la fixation de la calpastatine à la  $\mu$ -, la m-calpaïne et la forme autolysée de la m-calpaïne est inférieure à celle requise pour leur activité protéolytique (Kapprell et Goll, 1989), alors que celle requise pour

la fixation à la forme autolysée de la  $\mu$ -calpaïne est approximativement la même que celle nécessaire à l'activité. Ceci suggère qu'en cas d'augmentation de la concentration en calcium, étant donné que la calpastatine et les calpaïnes sont co-localisées dans la cellule, la calpastatine se fixera aux calpaïnes avant l'initiation de l'activité protéolytique (Otsuka et Goll, 1987). La concentration requise en calcium pour la fixation étant dépendante de la calpaïne impliquée, le besoin en calcium est donc dû aux calpaïnes et non à la calpastatine, d'autant que rien ne permet de penser que la calpastatine fixe le  $\text{Ca}^{2+}$  (Kapprell et Goll, 1989). Comme nous l'avons indiqué précédemment, la calpastatine est constituée de quatre domaines inhibiteurs (I, II, III et IV). Les domaines I, II, III et IV inhibent chacun une molécule de calpaïnes et présentent chacun trois sous-domaines, A, B et C responsables de la fixation aux calpaïnes et de l'inhibition. Les sous domaines A et C se fixent, en présence de calcium, respectivement aux domaines IV et VI des calpaïnes (Ma *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1994). La structure cristallographique d'un peptide comportant le sous-domaine C de la  $\mu$ -calpaïne humaine et du domaine VI porcin a été déterminée (Todd *et al.*, 2003). Cette structure montre que le peptide se fixe dans une poche hydrophobe formée grâce à la fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  sur le motif EF-1'. La fixation de la calpastatine au domaine VI s'accompagne et /ou est le résultat d'un changement de conformation dans le domaine VI et le sous-domaine C. Ce changement entraîne la formation d'une poche hydrophobe ouverte à la surface du domaine VI et d'une hélice  $\alpha$  dans le sous-domaine C alors que la calpastatine entière a été décrite comme ayant très peu de structure secondaire (Ishima *et al.*, 1991; Uemori *et al.*, 1990). Des études de modélisation utilisant la structure du domaine IV dans la structure cristallographique de la m-calpaïne indique que la fixation du sous-domaine A au domaine IV des calpaïnes serait similaire à celle du sous-domaine C au domaine VI. Cette fixation impliquerait une poche hydrophobe formée en réponse à la fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  sur le motif EF-1 et la formation d'une hélice  $\alpha$  au niveau du domaine A de la calpastatine (Todd *et al.*, 2003). Ces deux sous-domaines, A et C, n'ont cependant aucune activité inhibitrice seuls (Takano *et al.*, 1995). La suppression du sous-domaine B, par contre, entraîne une abolition de l'activité inhibitrice (Kawasaki *et al.*, 1989; Maki *et al.*, 1989; Maki *et al.*, 1988). Des peptides comportant une partie plus ou moins longue de la séquence du sous-domaine B présentent une plus ou moins forte inhibition (Uemori *et al.*, 1990). Il a été montré que la fixation du domaine B aux calpaïnes est indépendante du calcium, mais qu'en présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , le taux de fixation est accru (Croall et McGrody, 1994). Une inhibition de 10-80 % par rapport à un domaine entier a été observée lorsque le sous-domaine B est associé au A ou au C (Ma *et al.*, 1994). L'étude de peptides de différentes tailles a montré que plus la séquence peptidique est longue, plus l'efficacité d'inhibition



**Figure 10. Modélisation de la fixation des sous-domaines A, B et C de la calpastatine à la m-calpaïne.**

Les sous-domaines A, B et C (en rose) de la calpastatine sont superposés à la structure cristallographique de la m-calpaïne (Reverter *et al.*, 2001a). La fixation calcium-dépendante des sous-domaines A et C est représentée en fonction des données publiées (Todd *et al.*, 2003). La position du sous-domaine B est putative et est basée sur les données publiées par Croall et McGrody (1994). La représentation schématique du complexe calpaïne/calpastatine présentée dans cette figures est d'après (Wendt *et al.*, 2004).

est importante, dans la mesure où le peptide en question comporte au moins une partie du sous-domaine B (Ma *et al.*, 1994; Maki *et al.*, 1989; Uemori *et al.*, 1990). De nombreuses études cinétiques ont également montré que l'inhibition, par des segments de calpastatine contenant le sous-domaine B, était compétitive (Betts *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 1989; Maki *et al.*, 1988), suggérant que ces segments interagissent à proximité du site actif. Cependant, un peptide de 27 résidus, mimant le sous-domaine B, se fixerait au résidu cystéine en position 498 dans le domaine III de la grande sous-unité de la m-calpaïne, et pas au résidu cystéine présent dans le site actif (Croall et McGrody, 1994). De plus, il a été démontré que la calpastatine ne se fixait pas aux domaines catalytiques (IIa et IIb) de la  $\mu$ - et de la m-calpaïne (Crawford *et al.*, 1993; Nishimura et Goll, 1991). Il semblerait donc que le sous-domaine B de la calpastatine ne se fixe pas au niveau du site actif mais qu'il pourrait agir en bloquant l'accès au site catalytique. Il se trouve que la fixation du peptide de 24 résidus, mimant le sous-domaine B, est accrue en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  (Croall et McGrody, 1994). Ceci suggère que le sous-domaine B ne se fixerait aux calpaïnes qu'après les changements de conformation induits par le calcium et initiant l'activité protéolytique. Cette fixation se situerait au moins en partie au niveau du domaine III et résulterait en un blocage de l'accès des substrats au site actif de la molécule activée. De cette manière, la calpastatine s'attacherait aux domaines IV et VI des calpaïnes et la boucle comportant le sous-domaine B bloquerait l'accès au site actif dès que la molécule serait activée (Figure 10). Dans ce paragraphe, le rôle des séquences peptidiques L et XL n'a pas été abordé. En fait, aucun rôle précis ne leur a été attribué même s'il a été suggéré que ces séquences auraient un rôle régulateur. Une régulation fine de l'inhibiteur spécifique des calpaïnes permettrait par là même de réguler l'activité protéolytique de celles-ci. L'utilisation de promoteurs distincts et le phénomène d'épissage alternatif, très répandu dans cette région, engendrent une diversité des séquences potentiellement régulatrices. Certaines formes pourraient spécifiquement avoir une localisation subcellulaire particulière ou encore subir une modification post-traductionnelle (phosphorylation, protéolyse...) et par conséquent inhiber plus ou moins la  $\mu$ - et/ou la m-calpaïne en réponse à un ou plusieurs stimuli externes.

## E. Spécificité de protéolyse

En général, les calpaïnes lysent les protéines à un nombre limité de sites engendrant la formation de grands polypeptides. Elles modifient plus qu'elles ne détruisent leurs cibles. Globalement, plus de 100 protéines ont été identifiées comme étant clivées par les calpaïnes. Une

première étude a montré que les calpaïnes clivaient préférentiellement au niveau de séquences présentant un résidu valine ou leucine et un résidu Arginine ou lysine en position P<sub>2</sub> et P<sub>1</sub>, respectivement (Sasaki *et al.*, 1984). Cependant, ce type de règle ne s'applique pas à tous les sites de clivages décrits (Sakai *et al.*, 1987). Il a été également démontré que la mutation d'une séquence PEST (Pro, Glu (Asp) et Ser/Thr) pouvait abolir (Noguchi *et al.*, 1997; Shumway *et al.*, 1999) ou n'avoir aucun effet (Carillo *et al.*, 1996; Molinari *et al.*, 1995) sur le clivage par les calpaïnes. Il a été aussi suggéré que le clivage des calpaïnes dépendrait plus de la conformation de la chaîne peptidique que de sa séquence (Sakai *et al.*, 1987). Récemment, l'étude de 106 substrats des calpaïnes a permis de déterminer une séquence consensus. La mutation de certains des résidus de cette séquence a une influence sur le clivage suggérant tout de même l'importance de la séquence peptidique (Tompa *et al.*, 2004). Quoiqu'il en soit, la séquence et la conformation du peptide clivé sont reconnues par les calpaïnes. Ces deux éléments coopéreraient pour obtenir un clivage spécifique par les calpaïnes. Enfin, la phosphorylation des protéines cibles semblerait agir sur le clivage. En effet, il a été notamment démontré qu'une phosphorylation de la troponine I par la PKA réduisait la sensibilité à la  $\mu$ -calpaïne d'environ 5 fois alors qu'une phosphorylation par la PKC augmentait cette sensibilité d'environ deux fois (Di Lisa *et al.*, 1995). D'autres études ont également montré une influence spécifique de la phosphorylation sur le clivage des calpaïnes (Chen et Stracher, 1989; Zhang *et al.*, 1988). En résumé, la séquence peptidique, elle-même, ainsi que sa conformation semblent avoir un rôle dans la spécificité de clivage. Cependant cette spécificité peut-être affectée par une phosphorylation sur la protéine cible. Ce type de phosphorylation, en réponse à un signal extra-cellulaire, pourrait expliquer en partie le clivage de certaines protéines à un moment précis.

### III. Fonctions physiologiques et implications pathologiques

La famille des calpaïnes a été impliquée dans un grand nombre de fonctions physiologiques (Figure 9) et d'états pathologiques. Dans cette section, seules les données obtenues concernant quelques fonctions physiologiques, pour lesquelles le rôle des calpaïnes ubiquitaires est relativement bien établi, ainsi que concernant les implications pathologiques de calpaïnes conventionnelles ou non conventionnelles, vont être présentées.

## A. Fonctions physiologiques

La description de certains effets des calpaïnes sur la cellule a pu être obtenue principalement grâce à l'utilisation d'inhibiteurs non spécifiques. Il est donc difficile dans ces cas là de déterminer si l'effet de l'inhibition observé sur la cellule est dû seulement à l'inhibition des calpaïnes. Le seul inhibiteur spécifique des calpaïnes connu à ce jour reste la calpastatine. Le fait que les calpaïnes clivent les polypeptides à un nombre limité de sites, conduisant à la formation de fragments présentant souvent une activité catalytique, indique que les calpaïnes ont un rôle régulateur dans les cellules plutôt que destructeur comme les protéases lysosomales et le protéasome. Dans cette partie, le rôle des calpaïnes dans la migration et la fusion des myoblastes, dans la transduction du signal, dans le cycle cellulaire, dans la régulation de l'expression des gènes et l'apoptose vont être abordés (Figure 9).

### 1) Migration et fusion des myoblastes

Durant le développement du muscle squelettique, les myoblastes embryonnaires se retirent du cycle mitotique, s'alignent puis fusionnent pour former des cellules plurinucléées. Ces cellules accumulent ensuite des protéines spécifiques du muscle squelettique telles que l'actine, la myosine et la titine pour former les fibres musculaires. La fusion des myoblastes requiert un important remodelage aux jointures entre le cytosquelette et la membrane plasmique, au niveau des points de fusion. La microinjection de calpastatine dans des myoblastes juste avant la fusion stoppe celle-ci complètement, sans tuer les cellules, qui peuvent fusionner après évacuation de l'excès de calpastatine (Temm-Grove *et al.*, 1999). En outre, l'ajout d'un oligodésoxyribonucléotide anti-sens de la m-calpaïne diminue le nombre de myoblastes entamant un processus de fusion d'environ 50 % (Balcerzak *et al.*, 1995) et l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques mais non spécifiques des calpaïnes, abolit quasiment la fusion des myoblastes (Kwak *et al.*, 1993b). Une étude portant sur des myoblastes de rat (lignée L8) a montré une diminution par 10 fois de la quantité de calpastatine avant le phénomène de fusion alors que la quantité de la  $\mu$ - et la m-calpaïne reste quasi-constante (Barnoy *et al.*, 1996). Toujours sur la même lignée cellulaire, il a été démontré que les calpaïnes ubiquitaires étaient des protéines stables dans les myoblastes en division et en différenciation. Par contre, la calpastatine est moins stable dans les cellules en différenciation que dans celles en division. Dès l'initiation de la différenciation, une inhibition de la synthèse de calpastatine est observée suivie d'une diminution du niveau d'ARNm (Barnoy *et al.*, 2000). Cette diminution de la quantité de

calpastatine, peu avant la fusion, serait due à une dégradation par la caspase-1 dans les cellules L8 (Barnoy et Kosower, 2003). Par ailleurs, une association entre la calpastatine et chacune des calpaïnes ubiquitaires a été observée, par immunoprécipitation, dans des myoblastes L8 en division, suggérant qu'il s'agirait bien d'une diminution de la quantité de calpastatine qui entraîne l'augmentation de l'activité protéolytique des calpaïnes nécessaire à la fusion. Une autre équipe a également démontré une diminution de la calpastatine tant au niveau des transcrits que des protéines dans un autre type cellulaire (Balcerzak *et al.*, 1998). En revanche, une étude dans des myoblastes de poulet a montré un accroissement du taux de m-calpaïne mais pas de  $\mu$ -calpaïne, ni de calpastatine (Kwak *et al.*, 1993a). Les différences observées semblent être dépendante du type cellulaire étudié, leur origine n'étant pas connue. Une étude utilisant une lignée cellulaire myoblastique surexprimant le gène codant la  $\mu$ -calpaïne a clairement mis en évidence le rôle de cette protéine dans la myogénèse (Moyen *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été montré qu'en plus de leurs substrats connus, les calpaïnes dégradent une protéine appelée MARCKS (Myristoylated alanine-rich C kinase substrate). Une fois phosphorylée par la PKC, cette protéine serait dégradée par les calpaïnes ce qui entraînerait la fusion des myoblastes de type C2C12. Il est certain que MARCKS a un rôle primordial dans la fusion puisque sa surexpression inhibe la fusion, alors que l'effet inverse est observé lors d'une sous-expression (Dulong *et al.*, 2004). Récemment, l'utilisation d'une lignée cellulaire clonée, surexprimant 4 fois la calpastatine, a montré une inhibition totale du processus de migration et de fusion des myoblastes (Dedieu *et al.*, 2003b). Cette lignée clonée présente également des problèmes d'adhésion. Une importante accumulation de la protéine MARCKS a été observée, suggérant que la protéolyse de cette protéine, qui se fixe à l'actine, est calpaïne-dépendante et peut-être impliquée dans l'adhésion et la migration des myoblastes. Toutes ces études démontrent l'implication du système calpaïnes/calpastatine dans la migration et la fusion des myoblastes.

## **2) Transduction du signal**

Il y a plus de 15 ans, le clivage de la PKC par les calpaïnes, conduisant à une enzyme constitutivement active, a été mis en évidence (Kishimoto *et al.*, 1989). Cette découverte a conduit à l'hypothèse que les calpaïnes pouvaient être impliquées dans les phénomènes de transduction du signal. Des études *in vitro* ont permis de montrer le clivage par les calpaïnes de plusieurs kinases, phosphatases et protéines du cytosquelette, impliquées dans des voies de transduction du signal. Il a été montré que les calpaïnes participeraient à la voie de transduction par les intégrines, récepteurs membranaires d'adhésion cellulaire, et que seules la famille des  $\beta$ -intégrines est clivée par celles-

ci (Pfaff *et al.*, 1999). Le clivage par les calpaïnes intervient au niveau de plusieurs sites dans la moitié C-terminale du domaine cytoplasmique des  $\beta$ -intégrines spécialement à proximité de régions conservées impliquées dans la fixation aux protéines du cytosquelette telles que la taline et la filamine.

Par ailleurs, des inhibiteurs synthétiques des calpaïnes ont permis d'observer une inhibition complète de la capacité des cellules endothéliales aortiques bovine à s'attacher à la matrice extracellulaire c'est-à-dire, entre autre, à s'étaler et former des complexes d'adhésion focaux. L'utilisation de différents inhibiteurs ainsi que la surexpression d'une forme inactive de la  $\mu$ -calpaïne indiquent que la  $\mu$ -calpaïne est impliquée dans ces changements au niveau des cellules endothéliales aortiques bovines. En présence d'inhibiteurs des calpaïnes, des cellules exprimant des formes constitutivement actives de RhoA et Rac1, qui sont des petites protéines G, conservent cependant certaines structures permettant l'adhésion à la matrice extracellulaire (Bialkowska *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 1999). Ceci suggère donc que la  $\mu$ -calpaïne agirait en amont des protéines Rac1 et RhoA dans cette voie de transduction du signal. Or il a été démontré que la régulation négative de RhoA est le résultat d'un clivage conduisant à la formation d'un fragment de 20 kDa et que ce clivage de RhoA est inhibé par des inhibiteurs des calpaïnes mais pas par ceux du protéasome et des caspases. De plus, *in vitro*, la  $\mu$ -calpaïne clive RhoA en produisant un fragment de 20 kDa (Kulkarni *et al.*, 2002). La  $\mu$ -calpaïne pourrait donc moduler l'activité de RhoA directement et régulerait la capacité des cellules endothéliales aortiques bovines à s'attacher à la matrice extracellulaire.

Les calpaïnes ont pu également être impliquées dans la transformation des cellules par l'oncogène, *v-src*. En effet, la surexpression de la calpastatine dans des cellules transformées par *v-src* supprime la dégradation de certaines protéines telle que la ppFAK<sup>125</sup> (Focal Adhesion Kinase), induit des changements de morphologie et diminue la prolifération (Carragher *et al.*, 2002). De plus, la transformation par *v-src* ayant peu d'effets sur des fibroblastes issus de souris KO pour la petite sous-unité des calpaïnes (Arthur *et al.*, 2000), l'activité des calpaïnes semblerait donc nécessaire à la transformation des cellules par *v-src*.

Le rôle des calpaïnes dans un grand nombre de voies de transduction du signal apparaît de plus en plus évident. Il s'avérerait également que différentes cellules et différentes voies de transduction impliquent soit la  $\mu$ - soit la m-calpaïne et pas forcément les deux. Enfin, les calpaïnes peuvent avoir différents rôles dans un même type cellulaire selon la voie de transduction qui est activée.

### **3) Cycle cellulaire**

De nombreuses études utilisant des inhibiteurs synthétiques ont suggéré que l'activité calpaïne est requise pour la progression dans le cycle cellulaire, particulièrement lors du passage de la phase G<sub>1</sub> à S. Pourtant, des fibroblastes de souris KO pour la petite sous-unité des calpaïnes (*Capn4*<sup>-/-</sup>), n'ayant aucune activité calpaïne détectable, prolifèrent normalement (Arthur *et al.*, 2000).

La privation de sérum appliquée à des cellules NIH3T3 résulte en une perte rapide de la cycline D1, connue pour être impliquée dans la progression vers la phase G<sub>1</sub>. Cette perte de cycline D1 est prévenue par l'addition d'inhibiteurs synthétiques des calpaïnes ou par la surexpression de la calpastatine (Choi *et al.*, 1997). La cycline D1 est également dégradée par le protéasome, cependant l'utilisation d'inhibiteur du protéasome ne prévient pas la perte de cycline D1 après une privation de sérum. De la même façon, la progression vers la phase G<sub>1</sub> de fibroblastes WI-38 privés de sérum est empêchée par un inhibiteur synthétique des calpaïnes (E64d) alors que la lactacystine, inhibiteur du protéasome, a peu d'effet (Mellgren, 1997). Des cellules de type CHO résistantes à un inhibiteur synthétique des calpaïnes, présentent une diminution du niveau de  $\mu$ -calpaïne alors que les niveaux de m-calpaïne et calpastatine restent inchangés. Ces cellules montrent également une augmentation de 50 % du temps de doublement, due à une phase G<sub>1</sub> prolongée (Mellgren *et al.*, 1996). D'autres études utilisant diverses combinaisons d'inhibiteurs suggèrent également une implication des calpaïnes dans la progression vers la phase G<sub>1</sub>. Pourtant, il a été montré que des cellules EcR-CHO surexprimant la calpastatine ainsi que des fibroblastes issus de souris *Capn4*<sup>-/-</sup> prolifèrent (Xu et Mellgren, 2002). Ces résultats indiquent que l'activité des calpaïnes ne paraît pas indispensable au bon déroulement de la mitose. Les calpaïnes pourraient servir comme une alternative ou comme une fonction supplémentaire à la voie protéolytique du protéasome, principal régulateur protéolytique du cycle cellulaire.

### **4) Régulation de l'expression des gènes**

L'hypothèse selon laquelle les calpaïnes seraient impliquées dans la régulation de l'expression des gènes repose sur la capacité de celles-ci à cliver *in vitro* des facteurs de transcription tels que c-Jun, c-Fos (Hirai *et al.*, 1991; Pariat *et al.*, 2000) et p53 (Gonen *et al.*, 1997; Kubbutat et Vousden, 1997; Pariat *et al.*, 1997). Ces mêmes facteurs de transcription sont également dégradés par le protéasome et il semblerait qu'il s'agisse de la voie principale de dégradation. Du fait d'une localisation préférentielle des calpaïnes dans le cytoplasme, la dégradation des facteurs de transcription par les

calpaïnes se situerait dans celui-ci. Toutefois, certaines études ont montré une localisation nucléaire, de la  $\mu$ -calpaïne (Gil-Parrado *et al.*, 2003). Les calpaïnes, sous l'influence de stimuli particuliers, pourraient donc être localisées dans le noyau et par conséquent agir, entre autre, sur des facteurs de transcription. La surexpression de la calpastatine dans des cellules de type NIH3T3 diminue le taux de dégradation de c-Jun et l'introduction d'un oligodésoxyribonucléotide anti-sens de calpastatine provoque l'effet inverse (Hayashi *et al.*, 1992). De plus, la co-transfection de cellules ne présentant pas le gène codant p53, avec des vecteurs contenant p53 et la calpastatine, résulte en l'accroissement de l'activité transcriptionnelle p53-dépendante. Enfin, des mutants de p53, présentant une structure tertiaire altérée, montrent des susceptibilités différentes aux calpaïnes, certaines formes de p53 sont plus sensibles, alors que d'autres sont plutôt résistantes (Pariat *et al.*, 1997). Il apparaît donc que les facteurs de transcription c-Jun, c-Fos et p53 sont dégradés *via* différentes voies qui peuvent impliquer les calpaïnes, même si la voie du protéasome est prédominante.

### 5) L'apoptose

L'implication des calpaïnes dans le phénomène d'apoptose a été suggérée pour la première fois en 1993. D'après les connaissances actuelles, il apparaît que les calpaïnes interviendraient dans l'apoptose, dans certains types cellulaires et en réponse à des stimuli spécifiques (Kidd *et al.*, 2000). Un grand nombre de protéases interviennent à différents niveaux dans l'apoptose. Les caspases, des cystéines protéases calcium-indépendantes, ont un rôle majeur, mais le protéasome et les cathepsines lysosomales semblent aussi être impliqués dans certaines voies apoptotiques. Etant donné que les inhibiteurs utilisés dans la plupart des études ne sont pas spécifiques des calpaïnes, il est difficile de distinguer les effets dus aux différents systèmes protéolytiques. En revanche, l'injection ou la surexpression de la calpastatine a clairement montré l'implication des calpaïnes dans certains types cellulaires et en réponse à certains stimuli (Chi *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2002; Ruiz-Vela *et al.*, 2001; Squier *et al.*, 1999). La détection des produits de dégradation de l' $\alpha$ -spectrine spécifiques des calpaïnes (150/145 kDa) dans des cellules apoptotiques, renforce l'idée qu'elles sont impliquées dans le phénomène (Saido *et al.*, 1993). En effet, les caspases dégradent l' $\alpha$ -spectrine en deux fragments spécifiques de 150 et 120 kDa, permettant de distinguer clairement la protéolyse par les calpaïnes de celles par les caspases (Martin *et al.*, 1995). Comprendre le rôle des calpaïnes dans l'apoptose est compliqué par le fait que les calpaïnes ont la capacité de cliver les caspases elles-mêmes ainsi que de nombreuses autres protéines régulant la progression dans l'apoptose. Plusieurs

études ont montré que les calpaïnes clivent les caspases-7, -8 et -9, et les inactivent (Chua *et al.*, 2000). Par ailleurs, la m-calpaïne a été rapportée comme clivant la procaspase-12, générant une caspase active, ainsi que Bcl-x1, transformant ainsi une molécule anti-apoptotique en une molécule pro-apoptotique (Nakagawa et Yuan, 2000). Par conséquent, dans certains cas les calpaïnes agissent comme régulateurs positifs et dans d'autres cas comme régulateurs négatifs de l'apoptose. Il a été montré que les caspases dégradent la calpastatine, suggérant un effet des calpaïnes en aval des caspases (Wang *et al.*, 1998). Au contraire, l'apoptose dans les cellules plaquettaires humaines semble être initiée par les calpaïnes plutôt que par les caspases (Wolf *et al.*, 1999). Enfin, l'examen de l'apoptose dans des neutrophiles a révélé un effet synergique des caspases, des calpaïnes et du protéasome pour accomplir l'apoptose dans ces cellules, les calpaïnes et le protéasome agissant en aval des caspases (Knepper-Nicolai *et al.*, 1998).

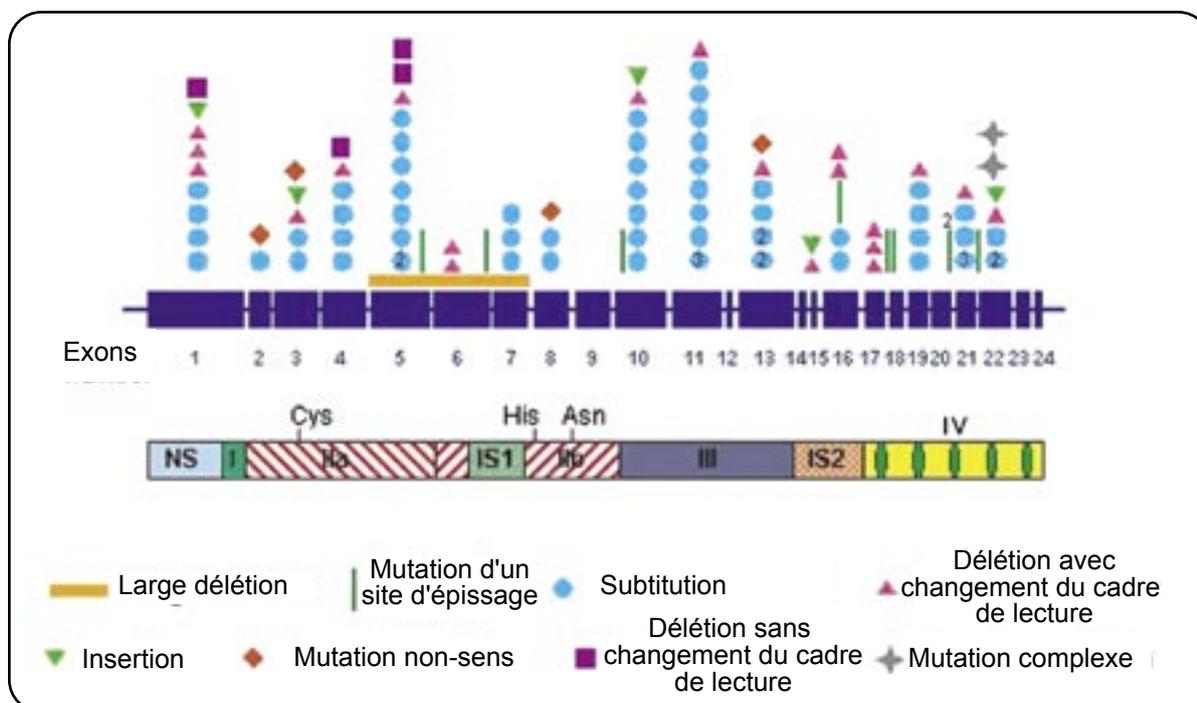
En résumé, il apparaît clairement que les calpaïnes jouent un rôle dans certaines voies apoptotiques. Une utilisation accrue, dans de nouvelles études, de l'inhibiteur spécifique des calpaïnes, la calpastatine, permettra sûrement de préciser la fonction de ces protéases dans l'apoptose.

## **B. Implications pathologiques**

Les calpaïnes ont été impliquées dans un certain nombre de pathologies souvent classées en deux groupes : les pathologies d'origine génétique, lorsqu'une mutation dans un gène codant une calpaïne est liée à la maladie, et les pathologies liées à une perte de l'homéostasie, une élévation de la concentration en calcium intracellulaire entraîne une dérégulation de l'activité protéolytique des calpaïnes. Dans cette partie, deux pathologies d'origine génétique, la dystrophie des ceintures de type 2A et le diabète de type II, ainsi que deux pathologies liées à une perte de l'homéostasie, la maladie d'Alzheimer et la cataracte, vont être traitées.

### **1) La dystrophie des ceintures de type 2A (LGMD2A)**

La dystrophie des ceintures de type 2A (LGMD2A pour *limb girdle muscular dystrophy*) est une maladie génétique autosomale récessive caractérisée par une atrophie symétrique des muscles des ceintures pelvienne et scapulaire, une élévation de la concentration sérique de créatine-kinase et un aspect nécrose-régénération sur les biopsies. Dans la majorité des cas, les symptômes surviennent durant l'enfance et s'aggravent progressivement jusqu'à la perte de la marche en 10 à 20 ans (Laval



**Figure 11. Distribution des mutations décrites dans le cadre de la LGMD2A sur le gène codant la calpaïne 3.**

Les différentes mutations sont représentées au-dessus de la représentation schématique du gène codant le calpaïne 3 (en bleu) et de la protéine (d'après (Branca, 2004)).

et Bushby, 2004). Le gène responsable de cette forme de dystrophie a été identifié par clonage positionnel et code la calpaïne 3, ou p94 (Richard *et al.*, 1995). Plus de 100 modifications du gène *Capn3* ont été identifiées ; 97 mutations, 12 polymorphismes et 5 variants qui n'ont pu être classifiés ni dans les mutations ni dans les polymorphismes. Ces mutations sont dispersées tout le long du gène (Figure 11). L'effet de certaines des mutations observées chez les patients atteints sur l'activité de la protéine a été testé en exprimant les formes mutées dans des cellules COS7 (Herasse *et al.*, 1999). Il a été montré que les formes mutées de p94 perdent leur capacité à cliver l' $\alpha$ -spectrine et que certaines d'entre elles sont également affectées dans leur activité autolytique et leur capacité de fixation à la connectine, ou titine qui est une protéine structurale du muscle. Les effets structuraux de certaines mutations, impliquant des résidus très conservés, ont été prédits à partir de la structure cristallographique de la m-calpaïne (Jia *et al.*, 2001). La plupart de ces mutations pourraient altérer les interactions entre les différents domaines de la calpaïne 3, ce qui empêcherait un assemblage correct du site actif. La LGMD2A fut la première forme récessive de dystrophies des ceintures à être attribuée à une activité enzymatique déficiente plutôt qu'à une protéine structurale du muscle. Le plus déroutant est que la perte musculaire observée chez les patients atteints soit due à une perte

d'activité protéolytique. Une nouvelle piste est apparue lors de l'analyse de biopsies musculaires provenant de patients atteints de diverses pathologies. Cette étude a révélée la présence de noyaux apoptotiques uniquement au niveau des muscles issus de patients atteints de LGMD2A (Baghdiguian *et al.*, 1999). Pour que le défaut en calpaïne explique le phénomène d'apoptose, une possibilité était que cette enzyme ait une activité régulatrice sur des facteurs de transcription connus pour activer des gènes de survie, tel que NFκB. NFκB est un hétérodimère composé des sous-unités p65 (Rel A) et p50. Normalement, ce facteur est séquestré dans le cytoplasme *via* une interaction avec son inhibiteur IκBα qui masque la séquence de translocation nucléaire sur Rel A. La protéolyse d' IκBα permet la translocation nucléaire de NFκB qui va alors activer la transcription de ses gènes cibles, des gènes de survie. Or, une accumulation de NFκB et de IκBα dans le sarcoplasme et non dans le noyau est détectée dans les fibres apoptotiques de patients atteints de LGMD2A (Baghdiguian *et al.*, 2001). De plus, la calpaïne 3 est capable de dégrader IκBα. Il semblerait donc que, chez les patients atteints de LGMD2A, la calpaïne 3 ait perdu sa capacité à dégrader IκBα, conduisant à son accumulation dans le sarcoplasme ce qui empêcherait NFκB de transloquer dans le noyau et donc d'activer la transcription des gènes de survie et prévenir l'apoptose (Branca, 2004). Il semble ainsi qu'une relation de cause à effet entre déficience en calpaïne 3 et apoptose permettrait d'identifier les causes de la LGMD2A et d'entrevoir une stratégie thérapeutique.

## **2) Le diabète de type II**

Le diabète de type II souvent appelé aussi diabète non insulino-dépendant, est le résultat de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Il s'agit de la forme de diabète la plus répandue, environ 4 % de la population mondiale adulte est affectée. Cette forme de diabète se déclare entre 40 et 60 ans généralement, même si de plus en plus d'adolescents sont sujets à ce type de diabète. Un locus majeur de susceptibilité au diabète de type II a été détecté sur le chromosome 2 humain (Hanis *et al.*, 1996). Par clonage positionnel, le gène codant la calpaïne 10 a été identifié au sein du locus de susceptibilité au diabète de type II (Horikawa *et al.*, 2000). Les polymorphismes du gène *Capn10* ont été étudiés dans diverses populations présentant une propension plus ou moins importante à cette forme de diabète (Carlsson *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005; Del Bosque-Plata *et al.*, 2004; Iwasaki *et al.*, 2005; Lindsay *et al.*, 2002; Rasmussen *et al.*, 2002). Les variants génétiques du gène *Capn10* ont été associés avec une augmentation en acides gras libres et une résistance à l'insuline (Orho-Melander *et al.*, 2002). *In vitro*, il a été montré que les acides gras libres activent la protéine kinase C (PKC), ce qui entraîne une hyperphosphorylation des récepteurs à l'insuline,

conduisant à la réduction de l'activité kinase de ces récepteurs et enfin augmentant la résistance à l'insuline (Griffin *et al.*, 1999). Par conséquent, une sous-régulation de la PKC apparaît comme un facteur important dans le maintien du niveau de phosphorylation approprié des récepteurs à l'insuline (Itani *et al.*, 2000). Un polymorphisme dans l'intron 3 du gène codant la calpaïne 10 affecte son expression, les homozygotes G/G présentant une baisse des transcrits de la calpaïne 10 (Baier *et al.*, 2000). Donc, étant donné que la PKC est un substrat *in vivo* des calpaïnes, une moindre quantité de calpaïne conduirait à la sur-régulation de la PKC, réduisant le signal de l'insuline et induisant une résistance à celle-ci. Lorsque des îlots pancréatiques de souris sont exposés à un inhibiteur des calpaïnes, on observe une augmentation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, une diminution de l'assimilation de glucose induite par l'insuline dans les adipocytes et le muscle squelettique et enfin une diminution du taux de synthèse de glycogène dans le muscle (Sreenan *et al.*, 2001). Ce résultat supporte l'hypothèse émise plus tôt dans ce paragraphe quant au rôle de la calpaïne 10 dans la maladie. Il est à noter que l'utilisation d'inhibiteurs des calpaïnes peut conduire à une inhibition de toutes les calpaïnes présentes et pas seulement de la calpaïne 10. Enfin, plus récemment, la calpaïne 10 a été clairement impliquée dans la survie des cellules  $\beta$  du pancréas (Johnson *et al.*, 2004). Cette dernière découverte ouvre une nouvelle voie d'investigations pour déterminer le rôle exact de la calpaïne 10 dans le développement du diabète de type II.

### 3) La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative conduisant progressivement et irréversiblement à la perte de la mémoire et des fonctions cognitives. Deux processus dégénératifs caractérisent cette pathologie : l'amyloïdogénèse, qui consiste en le dépôt de peptide  $\beta$ -amyloïdes, A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42, entraînant la formation des plaques amyloïdes extracellulaires ; la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), qui résulte de l'agrégation intraneuronale de filaments de protéines Tau (protéine associée aux microtubules) hyperphosphorylées. Le rôle des calpaïnes dans la MA est plus complexe qu'une activité protéolytique excessive en réponse à une dérégulation de l'homéostasie. La concentration en calcium est plus élevée (Leissring *et al.*, 2000), le niveau en m-calpaïne est accru (Grynspan *et al.*, 1997; Tsuji *et al.*, 1998) et l'autolyse de la  $\mu$ -calpaïne est stimulée (Saito *et al.*, 1993) dans le cerveau des patients atteints de MA. Il a été suggéré que les dérégulations de l'activité des calpaïnes pourraient affecter la sécrétion des peptides  $\beta$ -amyloïdes, notamment par la conversion de la PKC en une kinase constitutivement active (Goll *et al.*, 2003). Les peptides A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 sont produits par clivages protéolytiques d'une protéine précurseur,  $\beta$ -APP. Ces clivages sont réalisés par

des protéases appelées sécrétases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Ces sécrétases n'ayant aucune relation avec les calpaïnes, ces dernières ne seraient donc pas impliquées dans la formation des plaques amyloïdes (Figueiredo-Pereira *et al.*, 1999) mais plutôt dans la dégénérescence neurofibrillaire. Or, il a été montré que les calpaïnes clive la protéine p35, activant la protéine kinase cycline-dépendante 5 (CDK5), en une protéine de 25 kDa (p25) ; la p25 ainsi activée prolonge l'activation de CDK5 (Kusakawa *et al.*, 2000). Le fait que la protéine Tau soit un substrat de CDK5 et, qu'une accumulation de p25 ai été mise en évidence dans le cerveau des patients atteint de MA (Lee *et al.*, 2000), suggèrent que la p25, clivée par les calpaïnes, est responsable de l'hyperphosphorylation de Tau, induisant la DNF (Selkoe, 2001). L'hyperphosphorylation de Tau rend cette protéine, qui est normalement clivée par les calpaïnes (Goll *et al.*, 2003), résistante à la dégradation par celles-ci (Litersky et Johnson, 1992). Enfin, du fait que les protéines neurofilamentaires sont d'excellents substrats des calpaïnes, les calpaïnes ont probablement un rôle important dans la mort neuronale par nécrose qui accompagne la MA. Les calpaïnes seraient donc impliquées dans la DNF mais il semblerait qu'elles interviennent également à d'autres niveaux. Quoiqu'il en soit, l'analyse structurale des cerveaux de patients atteints de MA montre que la formation des plaques amyloïdes et la désorganisation du cytosquelette intraneuronal peuvent avoir différentes origines, compliquant l'étude du rôle des calpaïnes dans cette maladie.

#### **4) La cataracte**

La cataracte est une affection de l'oeil aboutissant à l'opacité partielle ou totale du cristallin. Chez les mammifères, une accumulation de différents facteurs, tels que l'exposition aux rayons UV ou un niveau élevé en sucre (diabète), provoque la cataracte. Dans un oeil normal, les protéines du cristallin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) sont concentrées et organisées pour permettre le passage de la lumière. Dans plus de 75 % des cas de cataractes humaines, une concentration élevée en calcium est observée, concentration suffisante pour initier directement l'activité de la m-calpaïne, la calpaïne ubiquitaire la plus représentée dans le cristallin. Or, la m-calpaïne, dans le cristallin de rat, dégrade les protéines  $\alpha$  et  $\beta$  du cristallin dans leur partie N-terminale mais n'a aucun effet sur la protéine  $\gamma$ . Ces protéines, ainsi tronquées, s'agrègent, précipitent et deviennent résistantes à une quelconque autre protéolyse, conduisant *in fine* à l'opacité du cristallin (Goll *et al.*, 2003; Huang et Wang, 2001). Il est à noter que les fragments produits lors de la formation de la cataracte *in vivo* sont identiques, en électrophorèse deux dimensions, aux fragment produits *in vitro* par les calpaïnes (Goll *et al.*, 2003). Par ailleurs, Lp82, produit de la traduction d'un transcrit alternatif de *Capn3*, est présente dans le cristallin

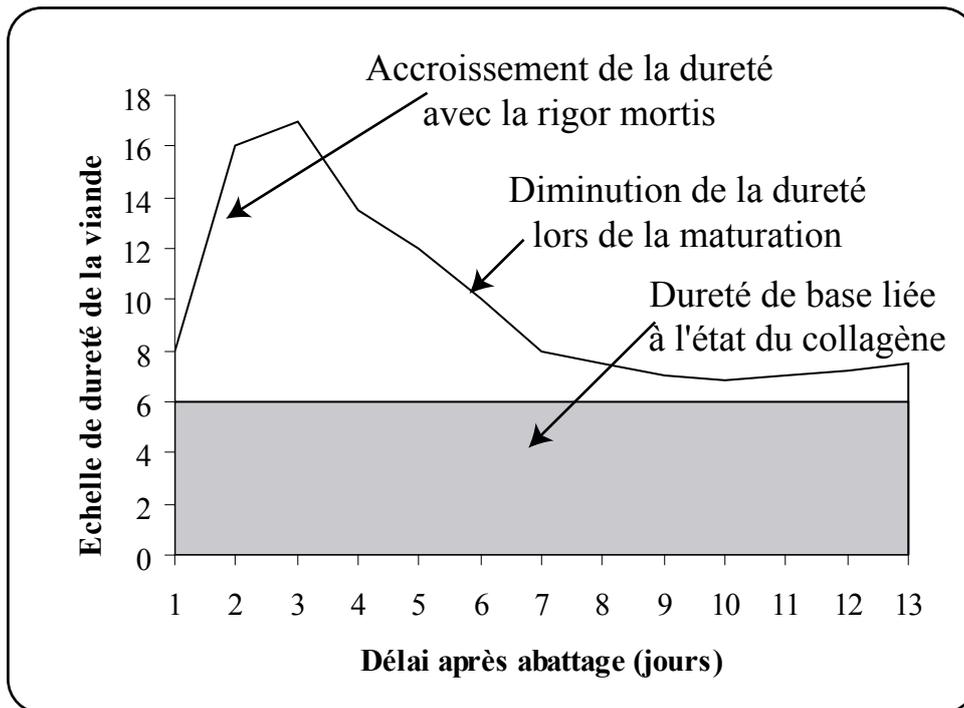
de jeunes rats en même quantité que la m-calpaïne et dégrade également les protéines  $\alpha$  et  $\beta$  du cristallin (Nakamura *et al.*, 2000). Cependant, l'expression de Lp82 diminue avec l'âge, remettant en cause son rôle dans la formation de la cataracte chez les animaux âgés. De plus, alors que la m-calpaïne est exprimée dans le cristallin humain, Lp82 n'est pas présente à cause d'un codon stop inséré dans l'exon 1 (Nakamura *et al.*, 2000). Le rôle des calpaïnes dans la cataracte humaine n'est pas aussi documentée que celle chez les rats, néanmoins la présence de la m-calpaïne dans le cristallin humain et le fait que les protéines du cristallin sont des substrats *in vitro*, font de la m-calpaïne une très bonne candidate pour expliquer la cataracte humaine au même titre que chez le rat.

## V. Qualité des viandes et protéolyse

Les consommateurs de viande sont aujourd'hui, et notamment dans les pays développés, demandeurs d'une viande de qualité constante. L'appréciation des consommateurs d'une viande de bonne qualité est en fait un jugement global résultant de la perception de plusieurs critères tels que la tendreté, la jutosité, la saveur (ou flaveur), le persillé (gras intramusculaire), et la couleur du muscle. Toutes ces caractéristiques ne sont pas complètement distinctes. En effet, il est reconnu que les acides gras (triglycérides et phospholipides...) intra et intermusculaires participent à la formation des arômes de la viande ainsi qu'à sa consistance. Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction générale, les caractéristiques recherchées ne sont ni uniques, ni fixes. Seule la tendreté semble faire l'unanimité à notre époque dans le sens où tous les consommateurs de viande, quelque soit leur pays d'origine, apprécient une viande tendre. Dans cette partie, nous allons traiter uniquement de la tendreté résultant du processus de maturation des viandes, puis du rôle des protéases et plus particulièrement du rôle du système calpaïnes/calpastatine dans les processus d'amélioration de la tendreté.

### **A. Maturation des viandes et tendreté**

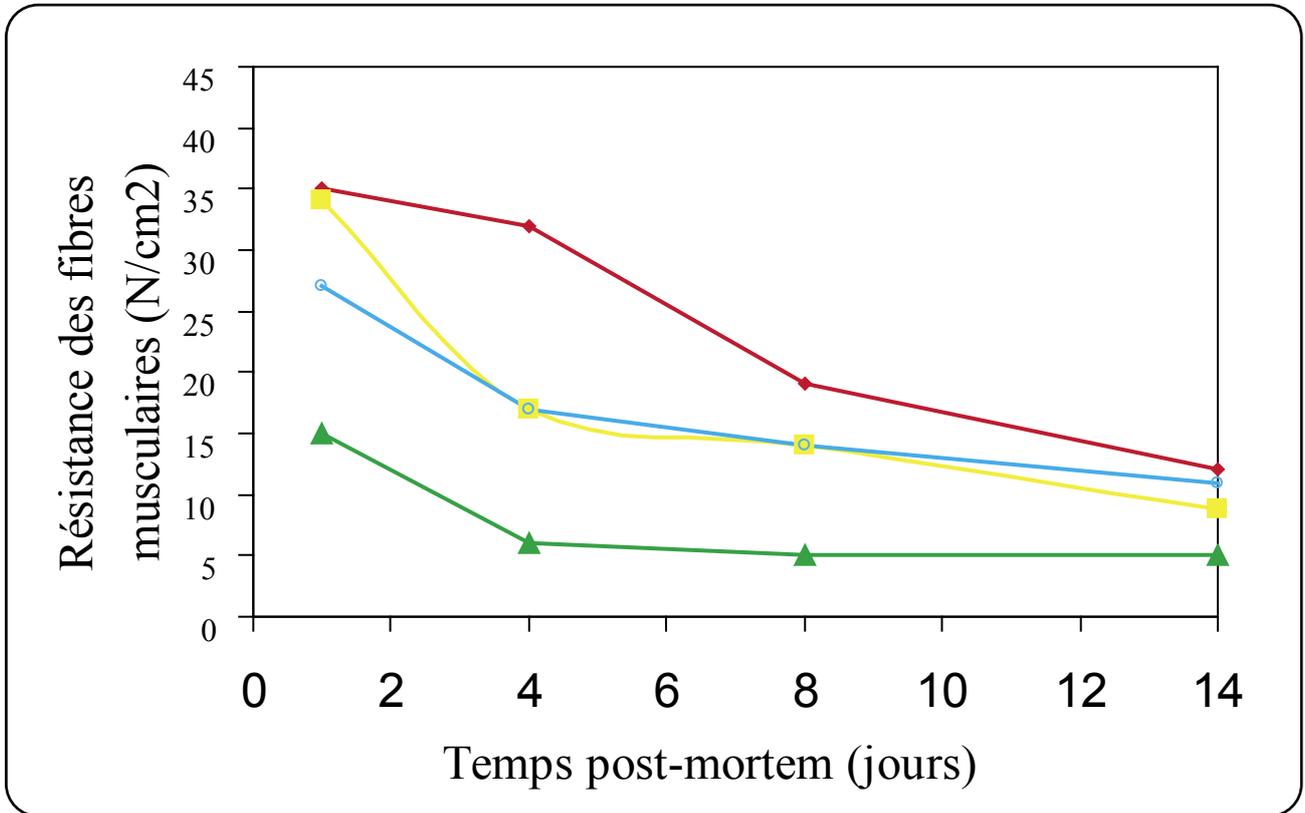
La tendreté est la résultante d'un processus appelé maturation faisant appel à un ensemble de processus très complexes, à la fois physico-chimiques et enzymatiques (Ouali, 1990; Geay *et al.*, 2001). Par ordre de vitesse de maturation décroissante, les viandes peuvent être classées dans l'ordre suivant : volailles, porc, lapin et bovin. Même si les processus de maturation sont similaires chez ces différentes espèces, nous n'allons traiter ici que le cas du bovin qui nous intéresse plus



**Figure 12. Illustration de l'évolution de la tendreté d'un muscle après abattage.**

Une échelle arbitraire de la dureté de la viande et le délai après abattage en jours, sont représentés en ordonnée et en abscisse, respectivement. L'aire grise indique la dureté de base due au collagène n'évoluant pas au cours de la maturation. La courbe noire représente l'évolution de la dureté de la viande due aux myofibrilles, dès la mort de l'animal jusqu'à 13 jours (adaptée de (Culioli, 1999)).

particulièrement. Le processus de maturation correspond à la transformation du muscle en viande et prend place lors du stockage à 4°C des carcasses après l'abattage des animaux. La transformation du muscle en viande comporte trois étapes chronologiques (Figure 12). La première, appelé phase de pré-rigor, est une courte période après l'abattage (20-30 min) durant laquelle des contractions musculaires ont lieu selon des impulsions nerveuses incontrôlées. Ce phénomène dure aussi longtemps que le système nerveux est encore actif. Durant la seconde phase, appelé *rigor mortis*, il y a établissement de la rigidité cadavérique, épuisement des réserves énergétiques (ATP et glycogène) conduisant à une baisse du pH jusqu'à ce qu'on appelle le pH ultime ( $\text{pH}_u = 5,4-5,7$ ). Au cours de cette phase, un raccourcissement du sarcomère est observé. Enfin, la dernière phase est la phase d'attendrissement. C'est durant cette période que la dégradation de certaines myofibrilles du muscle par les protéases endogènes a lieu, conduisant à une amélioration progressive de la tendreté. Alors que les deux premières phases se déroulent de manière quasi-identique quelque soit la carcasse, la phase d'attendrissement est très variable. La tendreté de la viande est liée à l'état du tissu conjonctif d'une part, et à l'état de maturation des fibres musculaires d'autre part. Dans les muscles, les éléments contractiles sont enveloppés dans un tissu conjonctif, principalement composé de collagène, souple mais très résistant. Trois types d'enveloppe conjonctive se distinguent : une gaine conjonctive qui entoure chaque fibre, une gaine qui enserre chaque paquet de fibres et enfin une gaine qui enveloppe l'ensemble du muscle et qui se prolonge par les tendons. Plus il y a de collagène, plus la viande est dure. Le taux de collagène d'un muscle définit sa destination culinaire : les viandes ayant une forte teneur en collagène sont retrouvées dans les morceaux à braiser ou à bouillir alors que celles présentant un faible taux de collagène constitueront les morceaux à griller. L'état du collagène fixe la dureté dite de base de la viande c'est-à-dire la dureté propre à chaque muscle. Cette dureté de base évolue pas ou peu au cours des différentes phases de maturation (Figure 12), certains auteurs rapportant parfois une dégradation du tissu conjonctif (Maltin et al., 2003). Par contre, les fibres musculaires sont sujettes à une protéolyse ménagée par les endoprotéases présentes dans le muscle au cours de la phase d'attendrissement. La durée de maturation généralement respectée par les professionnels est au minimum de 7 à 10 jours mais il est reconnu que la majorité des morceaux de viande atteignent une valeur de tendreté optimale au bout de 14 jours. La tendreté est connue comme étant éminemment variable. Cette variabilité est observée au travers des espèces, des individus mais également pour un même individu au



**Figure 13. Illustration de l'évolution au cours du temps de la résistance des fibres musculaires.**

Des mesures de forces de compression, à 1, 4, 8 et 14 jours, ont été réalisées sur un même muscle pour quatre individus différents représentés en rouge, jaune bleu et vert (adaptée de Lepetit et Damez, 2002).

travers des muscles. Ceci est due, d'une part, à la diversité des caractéristiques de composition du muscle (proportion des différents types de fibres) et, d'autre part, aux différences de vitesse de maturation. La différence dans les vitesses de maturation est généralement associée à la quantité d'endoprotéases, responsables de l'attendrissement, présentes dans le muscle. La Figure 13 illustre les différences qui peuvent être observées. Les mesures de tendreté sont effectuées sur un même type de muscle mais sur quatre individus différents à 1, 4 et 14 jours après l'abattage. On remarque dans un premier temps que toutes les courbes, et donc tous les morceaux de viande, tendent vers une valeur limite de tendreté vers 14 jours. Cependant, lorsque l'on observe la courbe représentée en vert, on constate que ce morceau de viande a atteint sa valeur optimale de tendreté dès 4 jours. Pendant les 10 jours qui suivent aucune amélioration n'est observée, ce qui signifie que ce morceau a été conservé « pour rien » pendant 10 jours à 4°C, conduisant à une élévation du coût de la viande. Deux solutions peuvent résoudre ce problème : le développement d'une méthode de mesure de la tendreté rapide et non destructive ou l'identification de marqueurs génétiques permettant de prédire le temps optimal de maturation d'une viande. Diverses équipes de recherche s'attèlent à trouver une nouvelle méthode de mesure pratique et non invasive contrairement à celles existantes (Institut de l'Elevage, 1992). Une méthode de terrain, appelée méthode de « pression du pouce » est couramment utilisée par les professionnels. Elle ne permet pas de classer les morceaux de viande dans des catégories de tendreté mais permet la pratique de l'affranchi, c'est-à-dire la séparation des parties dures des parties tendres d'un muscle. D'autres méthodes dites instrumentales peuvent être utilisées mais conduisent à la destruction de l'échantillon testé et donc à la dépréciation de la carcasse. Les deux méthodes les plus utilisées par les scientifiques pour évaluer la tendreté d'un morceau de viande sont la « Warner-Bratzler shear force » et la force de compression. La première est une force de cisaillement et la seconde repose sur une force de compression permettant d'exclure la composante collagénique sous certaines conditions. La « Warner-Bratzler shear force » est couramment utilisée dans les pays anglo-saxons alors qu'en France les deux méthodes sont pratiquées. La mesure de tendreté peut également être réalisée par la méthode d'analyse sensorielle grâce à un panel de consommateurs entraînés dans ce but. Cette méthode est bien évidemment destructive et présente une limite dans le sens où il est difficile pour le panel de ne tenir compte que de la tendreté, les autres caractéristiques organoleptiques pouvant influencer l'appréciation. Quoiqu'il en soit, les méthodes de mesure de la tendreté disponibles, à ce jour, sont imparfaites, peu reproductibles ou destructives et rien de concret n'est mis à la disposition des professionnels. Actuellement une équipe française développe, par exemple, une méthode de mesure basée sur la

spectroscopie de fluorescence frontale (Dufour et Frenchia, 2001). D'autres équipes de recherche, et ce dans le monde entier, s'intéressent au développement de marqueurs génétiques permettant de prédire le temps optimal de maturation. Cette partie du travail de recherche sera développée dans le paragraphe suivant. Pour résumer, la tendreté est une qualité de la viande très recherchée par les consommateurs et sa variabilité a un coût pour les professionnels de la viande. Pour exemple, aux Etats-Unis, l'inconsistance de la tendreté est évaluée à une perte de 200-300 millions de dollars par an (Veiseth et Koohmaraie, 2005). Il est donc important de faire un effort de recherche pour découvrir et analyser les déterminants de la variabilité observée, pour une part importante d'origine génétique, et pour *in fine* palier à ce problème.

## **B. La protéolyse *post-mortem*: rôle du système calpaïnes/calpastatine**

De nombreuses études ont tenté d'identifier les protéines dégradées lors de la maturation *post-mortem*. Les premiers résultats montraient qu'une dégradation du disque Z du muscle était responsable de l'attendrissement de la viande. Cependant, un composant majeur du disque Z, l' $\alpha$ -actinine, ne montre aucun signe de dégradation même après 15 jours de stockage *post-mortem* à 4°C (Veiseth et Koohmaraie, 2005). Par contre, des protéines telles que la desmine, la dystrophine, la vinculine et la vimentine, pour ne citer que ces exemples, semblent responsables de l'attendrissement (Taylor *et al.*, 1995). En effet, la dégradation de ces protéines diminue la rigidité des myofibrilles, conduisant à une viande plus tendre.

Le muscle squelettique comporte principalement trois systèmes endoprotéasiques pouvant être responsables de la dégradation des myofibrilles pendant la maturation *post-mortem* : le système des calpaïnes, les cathepsines lysosomales et le protéasome (voir pour revue Setandreu *et al.*, 2002). Pour être considéré comme réellement impliqué, un système protéolytique doit remplir deux conditions, en plus d'être endogène au muscle squelettique : les endoprotéases doivent avoir accès aux substrats et doivent être capables de reproduire le profil de dégradation des protéines observé après maturation. De ce fait, les cathepsines contenues dans le lysosome devraient être larguées dans le cytoplasme afin d'avoir accès aux substrats ; cette libération reste néanmoins controversée. Mais la principale raison pour laquelle un doute subsiste en ce qui concerne le rôle des cathepsines dans la maturation est la spécificité de substrats. En effet, l'actine et la myosine sont de très bons substrats des cathepsines, toutefois aucune dégradation de ces protéines durant la maturation n'a été montrée jusqu'alors (Koohmaraie, 1994). De plus, l'injection d'inhibiteurs des cathepsines dans un muscle de mouton n'a montré aucun effet sur la protéolyse des myofibrilles et l'attendrissement de

la viande (Hopkins et Thompson, 2001a; Hopkins et Thompson, 2001b). Quant au protéasome, il semblerait que les protéines myofibrillaires soient de mauvais substrats pour celui-ci (Koohmaraie, 1992a). En outre, une concentration accrue en calcium dans le muscle *post-mortem* améliore grandement la tendreté de la viande causée par une protéolyse plus importante (Koohmaraie *et al.*, 1988; Polidori *et al.*, 2000), et ni le protéasome ni les cathepsines ne sont activées pas le calcium (Koohmaraie, 1992b). Sur la base de ces arguments, le système des calpaïnes semblerait être le seul à remplir les conditions requises pour être impliqué dans la maturation de la viande.

En plus des études énoncées précédemment, des injections de chlorure de calcium dans un muscle de *Bos indicus* accélère le processus d'attendrissement (Veiseth et Koohmaraie, 2005). Il a été démontré également que l'injection de chlorure de calcium peu de temps après l'abattage était plus efficace pour l'obtention d'une viande plus tendre qu'une injection 12 ou 24 heures après l'abattage (Boleman *et al.*, 1995). L'incubation *in vitro* de myofibrilles purifiées avec les calpaïnes produit un profil protéolytique identique à celui observé dans la viande après maturation (Geesink et Koohmaraie, 1999; Huff-Lonergan *et al.*, 1996). De plus, l'incubation d'une fibre musculaire seule avec la  $\mu$ -calpaïne résulte en des disques Z plus fins et une moindre solidité de la fibre, démontrant la capacité de la  $\mu$ -calpaïne à réduire la solidité des fibres musculaires (Christensen *et al.*, 2003). Récemment, il a été rapporté que le niveau de transcrits de calpaïne 3 serait corrélé avec la tendreté finale dans la viande bovine et ovine (Ilian *et al.*, 2001) ; cette corrélation n'est cependant pas retrouvée au niveau protéique chez le porc (Parr *et al.*, 1999). De plus, l'absence de la calpaïne 3 dans des souris KO pour le gène correspondant, n'a aucun effet sur la protéolyse *post-mortem* (Veiseth et Koohmaraie, 2005), suggérant que la calpaïne 3 n'est pas impliquée dans ce processus. Quoiqu'il en soit, la preuve la plus évidente de l'implication des calpaïnes dans le processus de maturation a été apportée récemment. Grâce à une souris transgénique surexprimant le gène codant la calpastatine humaine spécifiquement dans les muscles, Kent et ses collaborateurs ont montré une diminution conséquente de la protéolyse *post-mortem* des fibres musculaires (Kent *et al.*, 2004). Ceci démontre clairement l'implication des calpaïnes, la calpastatine semblant jouer un rôle central au sein du système calpaïnes/calpastatine. Diverses études prouvent ce rôle prépondérant de l'inhibiteur. Il a été notamment démontré que les différences dans les vitesses de maturation entre les viandes porcine, ovine et bovine étaient causées par une variation de l'activité calpastatine à l'abattage (Ouali et Talmant, 1990). Ces mêmes auteurs ont également montré que le rapport enzyme/inhibiteur du système calpaïnes/calpastatine régit la vitesse d'attendrissement. Enfin, l'activité calpastatine à 24 h *post-mortem*, dans le muscle *Longissimus*, explique 44 % de la variation de tendreté,

mesurée par la «Warner Bratzler shear force» et par analyse sensorielle (Whipple *et al.*, 1990), alors que généralement 36 % de la variabilité est expliquée par plusieurs critères combinés (fibres, pH, collagène ; communication personnelle de J-F Hocquette).

Globalement, les principales études conduites dans le but de démontrer la liaison entre le système calpaïnes/calpastatine s'orientent vers des approches de type QTL ou de recherche de polymorphismes. Des recherches de QTL, sur des populations bovines croisées, ont révélées la présence de deux loci affectant la tendreté de la viande bovine, mesurée par la méthode de la « Warner-Bratzler shear force ». L'un est situé sur le chromosome 15 bovin (Keele *et al.*, 1999) et l'autre dans la région télomérique du chromosome 29 bovin (Casas *et al.*, 2000). Or, il se trouve que le gène codant la  $\mu$ -calpaïne a été cartographié dans la région télomérique du chromosome 29 bovin (Smith *et al.*, 2000). De plus, deux polymorphismes dans la partie codante du gène codant la  $\mu$ -calpaïne, entraînant deux substitutions au niveau de la séquence protéique, ont été mis en évidence et liés aux variations de tendreté (Page *et al.*, 2002). Les changements dans la séquence peptidique, engendrés par ces deux polymorphismes, n'ont cependant pas été corrélés à une quelconque modification de l'activité de la  $\mu$ -calpaïne. Dans le même temps, un brevet, déposé par une équipe australienne, montre une association entre la tendreté de la viande bovine et deux SNP (Single Nucleotide Polymorphism) situés dans la région 3'UTR du gène de la calpastatine bovine (Barendse, 2002). Ces découvertes récentes sont en corrélation avec l'implication du système calpaïnes/calpastatine dans le phénomène d'attendrissement de la viande après l'abattage. Il est à noter, cependant, que ces polymorphismes ne représenteraient pas les mutations causales expliquant l'inconsistance de la tendreté mais feraient plutôt partie d'un haplotype comportant la ou les mutations causales. En effet, étant donné la complexité du système calpaïnes/calpastatine, un long chemin reste à faire dans la compréhension des mécanismes régulant la protéolyse *post-mortem* des fibres musculaires. Cette compréhension semble pour le moins nécessaire si le monde scientifique souhaite contenter pleinement les professionnels de la viande.

# *Matériels et méthodes*



# I. Matériel biologique

## A. ADN génomique

Les échantillons d'ADN génomique utilisés pour la recherche de SNP et le génotypage des polymorphismes et du microsattelite sont issus d'animaux du troupeau expérimental de Bourges (programme Vachotron). Les animaux sont de race Charolaise et ont été caractérisés pour la tendreté de leur viande grâce à des mesures de forces de compression à 2, 7 et 14 jours. Les extractions d'ADN génomique ont été réalisées par Labogena.

Les échantillons d'ADN génomique utilisés pour les autres manipulations nous ont été gracieusement fournis par Cécile Grohs (INRA, Jouy en Josas). Ces échantillons sont au nombre de six et sont issus d'animaux du troupeau expérimental de Vauboyen : un individu de race Maine-Anjou, un charolais, un Montbéliarde, un croisé et deux normandes. L'échantillon le plus utilisé fut celui issu de l'individu Maine-Anjou.

## B. Tissus

Les tissus utilisés pour les extractions d'ARN et protéiques sont issus d'individus de race Charolaise du programme Vachotron. Des parties du cerveau, du cœur, du foie, de la rate, des reins, des testicules ainsi que de cinq muscles squelettiques (diaphragme, *Longissimus Dorsi*, *Rectus Abdominis*, *Semi Tendinosus* et *Transversus Abdominis*) ont été prélevés immédiatement après l'abattage, découpés en petit morceaux, congelés dans de l'azote liquide et enfin conservés à -80°C. Les animaux ont été abattus à l'abattoir expérimental du centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix.

## C. Anticorps

Un anticorps monoclonal commercial et cinq sérums polyclonaux de lapin générés contre des peptides synthétiques ont été utilisés pour la détection des différentes isoformes de calpastatine.

L'anticorps monoclonal (Anti-DomIV) est dirigé contre le domaine IV de la calpastatine (Calbiochem). Un des sérums de lapin (Anti-pepDomIV) est dirigé contre un peptide humain (NH<sub>2</sub>-ELDDALDQLSDSL-COOH), conservé chez le bovin, situé à l'extrémité N-terminale du domaine IV de la calpastatine. Cet anticorps a été gracieusement fourni par le Dr A. Ouali (INRA, Clermont-Ferrand/Theix). Les quatre autres sérums de lapin, Anti-Ex1xa, Anti-Ex1xb, Anti-DomXL et Anti-Ex3, sont dirigés contre des peptides de la calpastatine porcine correspondant aux produits

de traduction des exons 1xa (NH<sub>2</sub>-MSQPGQKPAASPRP-COOH), 1xb (NH<sub>2</sub>-MAFASWWYRKT-COOH), 1z et 2 (NH<sub>2</sub>-TAPVTKVSPSSAST-COOH), et 3 (NH<sub>2</sub>-AIPVSKQLEGPHSP-COOH), respectivement. Une bonne conservation entre les peptides de la calpastatine porcine et bovine est observée. Cinq parmi 14, 1 parmi 14 résidus différent entre les séquences peptidiques porcine et bovine correspondant au domaine XL et aux exons 1xa et 3, respectivement. Ces anticorps ont été gracieusement fournis par le Dr T. Parr (Université de Nottingham, UK).

Pour la révélation, deux anticorps secondaires porc-anti lapin et lapin-anti souris couplés à la peroxydase (POD) (DAKO) sont utilisés.

## D. Lignées cellulaires

Deux lignées cellulaires ont été utilisées pour révéler l'activité promotrice de certaines régions du gène codant la calpastatine (*CAST*). Une lignée nommée COS7, correspondant à des cellules de rein de singe vert de Madagascar transformées par SV40, et une lignée myoblastique murine, nommée C2C12, ont été utilisées.

## E. Vecteurs

Trois types de vecteurs ont été utilisés au cours du travail de thèse : le vecteur « pGEM® -T Easy » (Promega) pour le clonage des produits PCR, le vecteur puc18 (Invitrogen) pour le sous clonage de BAC, et le vecteur pEGFP-1 (Clontech) pour l'analyse des régions promotrice du gène codant la calpastatine. Le crible de sélection est l'ampicilline pour les deux premiers vecteurs et la kanamycine pour pEGFP-1.

Les BAC (Bacterial Artificial Chromosome) utilisé pour le travail de thèse sont issus de la banque de BAC bovine disponible au Centre de Ressources Biologiques en Génomique Des Animaux Domestiques d'Intérêt Economique (CRB GADIE, INRA, Jouy-en-Josas).

# II. Méthodes relatives aux acides nucléiques

## A. Préparation d'ADN plasmidique

### ***1) Mini-préparation et midi-préparation d'ADN plamidique***

L'ADN plamidique est purifié en petite quantité avec le kit « High Pure Plasmid Isolation » (Roche) et en quantité plus importante avec le kit « HiSpeed™ Plasmid Purification » (QIAGEN).

Le principe de ces kits est basé sur une lyse alcaline suivie d'une rétention de l'ADN plasmidique sur une résine échangeuse d'anions. L'ADN après purification est conservé à -20°C.

## **2) Midi-préparation d'ADN de BAC**

Les midi-préparations d'ADN de BAC sont réalisées à partir d'un protocole issu de « Molecular Cloning » et modifié par Jin-Tae Jeon (Jeon *et al.*, 2001). Un ml d'une préculture estensemencé dans un volume de 50 ml de milieu LB (Luria Bertoni) ayant une concentration finale de 12,5 µg/ml en chloramphénicol, pendant une nuit à 37°C avec agitation (250 rpm). La culture est centrifugée à 5000 g pendant 30 min. Le culot bactérien est repris dans 2 ml de solution I (50 mM de glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 8) et les bactéries sont lysées par l'addition de 4 ml de solution II (0,2 N NaOH, 1% SDS). Après 2 min de lyse à température ambiante, 3 ml de solution III (acétate de potassium 5 M, acide acétique glaciale) sont ajoutés. Après homogénéisation, les tubes sont incubés 30 min dans la glace et centrifugés 20 min à 5000 g et à 4°C. Le surnageant est prélevé et filtré sur de la gaze stérile et peut-être conservé à -20°C pendant plusieurs mois. L'ADN est ensuite précipité à l'isopropanol (750 µl de surnageant + 450 µl d'isopropanol) et récupéré par centrifugation pendant 15 min à 15000 g. Le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol glacé à 70%. Après séchage, le culot est repris dans 40 µl de tampon TE/RNase A (20 µg/ml final). Afin de resuspendre l'ADN, les tubes sont incubés à 37°C pendant 10 min.

## **B. Préparation d'ARN**

### **1) Préparation des ARN totaux**

Les échantillons de tissus sont traités après conservation à -80°C et broyé grâce à ULTRA-TURRAX® T25 basic IKA-WERKE. Le broyat est ensuite traité par le kit RNeasy Maxi Kit (Qiagen). Le principe repose sur la purification des ARN totaux par fixation sur une colonne en silice. La solution d'ARN totaux ainsi obtenu est aliquotée et conservée à -80°C.

### **2) Purification des ARN totaux en ARN messagers**

Les ARN messagers peuvent être purifiés, à partir d'ARN totaux, à l'aide du kit « NucleoTrap®poly (A) RNA » (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Le principe repose sur l'attachement des queues poly(A) des ARN messagers aux oligonucléotides poly(T) fixés sur des billes de silice. Les ARN messagers ainsi purifiés sont aliquotés et conservés à -80°C.

### 3) *Dosage des ARN*

La qualité et la quantité des ARN extraits sont contrôlées grâce à la méthode développée par Agilent Technologies. Les échantillons d'ARN sont traités avec le kit RNA 6000 Nano, déposés sur une puce Agilent RNA 6000 Nano LabChip et analysés avec un Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

#### C. Méthodes basées sur la réaction en chaîne de polymérisation (PCR)

##### 1) *Réaction de PCR (classique, « Touchdown », longs fragments)*

La technique d'amplification de l'ADN par la technique de PCR permet l'amplification, selon un mode exponentiel du nombre de copie d'un fragment d'ADN double brin. L'ADN est synthétisé par la polymérase de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) par extension à partir de deux amorces oligonucléotidiques.

Les PCR peuvent être réalisées dans un volume final de 10, 20 ou 50  $\mu$ l. Pour un volume final de 20  $\mu$ l, sont placés dans le tube 30 ng d'ADN en moyenne, 10 pmol de chaque oligonucléotide, 0,5 U de Taq polymérase en moyenne, 2 mM de  $MgCl_2$ , 0,25 mM de chaque désoxynucléotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et enfin 1X de tampon fourni avec la Taq polymérase. La Taq polymérase utilisé dans ce travail de thèse est la UptiTherm Taq Polymérase (Interchim). Jusqu'à 10 % de DMSO peut être ajouté dans le cas d'amplification de régions riches en nucléotides GC. La réaction classique est constituée de 3 étapes : une étape de dénaturation thermique (96°C, 3-4 min), une étape d'amplification de l'ADN pendant 35 cycles en moyenne (96°C, 30s pour la dénaturation thermique ; 55°C, 30s pour l'hybridation des amorces ; 72°C, 1min pour l'élongation) et une étape de terminaison de la synthèse d'ADN (72°C, 5min). Ce programme peut-être modifié notamment en fonction des amorces utilisées (température d'hybridation), de la taille de l'amplifiat (temps d'élongation) et de la Taq polymérase utilisée (température d'élongation).

D'autres types de méthodes peuvent être utilisés comme la méthode « Touchdown ». Cette méthode comporte une étape de dénaturation thermique et de terminaison de la synthèse d'ADN identique, par contre l'étape d'hybridation des amorces est un peu différente. En effet, les 30 cycles d'élongation classiques seront précédés de 7 cycles avec une diminution de 1°C de la température d'hybridation à chaque cycle, permettant d'augmenter la spécificité d'hybridation des amorces.

Enfin, l'amplification de long fragments peut être obtenue avec les kits « Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR System » et « Expand<sup>TM</sup> 20 kb<sup>plus</sup> PCR System » (Roche). Le principe repose sur

l'utilisation de deux ADN polymérase (*Taq* et *Pwo*) permettant d'accroître la processivité et l'élongation sur de longues distances (jusqu'à plus d'une vingtaine de kpb).

## **2) RT-PCR**

Afin de générer des fragments d'ADN complémentaire double brins à partir des ARN totaux, une transcription inverse est réalisée avec le kit « SuperScript™ II Reverse Transcriptase » (Invitrogen). Ensuite, 1 à 2  $\mu$ l de la solution ainsi obtenue d'ADNc est utilisée pour une PCR suivant une méthode adéquate à l'amplification recherchée (classique, « Touchdown », long fragments).

## **3) RACE-PCR (Rapid Amplification cDNA End's-PCR)**

La technique de RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) permet d'isoler les extrémités 5' et 3' des ADNc d'intérêt. Des ARN totaux ou messagers sont traités avec le kit « SMART™ RACE cDNA Amplification » kit (Clontech), selon les instructions du fabricant.

## **D. Electrophorèse d'acides nucléiques et purification**

### **1) Electrophorèse en gel d'agarose**

Les analyses se font par électrophorèse en gel d'agarose (dont la concentration varie en fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés) contenant du Bromure d'Étidium (Bet 0,5  $\mu$ g/ml). Le tampon utilisé peut-être du TAE (Tris 40 mM, acides caétiq 80 mM, EDTA 1 mM pH 8,3) ou du TBE (Tris-borate pH 8,0 89 mM, EDTA 2 mM pH 7,5). La migration s'effectue à 10 V/cm de gel environ. L'échantillon d'ADN auquel est ajouté du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, glycérol 40 %) est déposé sur gel. Un marqueur de taille approprié, comme par exemple le 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), est déposé en regard des échantillons et permet ainsi d'estimer la taille des fragments d'ADN.

### **2) Purification des fragments d'ADN après séparation sur gel d'agarose**

Le système d'extraction commercial « QIAquick gel extraction Kit » (Qiagen) a été utilisé pour l'extraction de fragments de tailles allant de 40 pb à 10 kpb. Son principe repose sur l'adsorption de l'ADN sur une colonne de silice.

## E. Clonage de fragments d'ADN

Le clonage consiste à insérer un fragment d'ADN dans un vecteur qui est ensuite introduit dans une cellule hôte. Le clonage consiste en deux étapes : une étape de ligature (ligature de produits PCR ou de fragments d'ADN à extrémités cohésives) permettant l'introduction du fragments d'ADN dans un vecteur et une étape de transformation consistant en l'introduction du vecteur dans la cellule hôte.

### **1) Ligature**

Au cours de cette thèse, le clonage de produits PCR a été effectué grâce au système « pGEM® -T Easy Vector System II » (Promega). Le principe repose sur le fait que la Taq polymérase ajoute des nucléotides A à chaque extrémité 3'OH du produit d'élongation. Le vecteur utilisé ici possède des nucléotides T à chaque extrémité 5' améliorant ainsi l'efficacité de clonage des produits PCR.

En ce qui concerne le clonage de fragments d'ADN dans les autres vecteurs, le vecteur et le fragment d'ADN à insérer sont préparés par digestion par des enzymes de restriction dans le but de présenter des extrémités compatibles. Une seule ou deux enzymes de restriction différentes peuvent être utilisées. L'utilisation de deux enzymes de restriction différentes permet le clonage directionnel. Les sites de clivage des enzymes de restriction sont soit présents sur le fragment ou soit introduits sur les amorces, utilisées lors de l'amplification du fragment, permettant leur addition à chaque extrémité du fragment. Lorsque le vecteur est ouvert avec une seule enzyme de restriction, ses extrémités 5' sont déphosphorylées, pour éviter une recircularisation. Les ligatures sont pratiquées dans un volume total de 20 µl contenant 50 ng de vecteur déphosphorylé, un rapport fragment à insérer sur vecteur (mol/mol) entre 2 et 10, 2 µl de tampon 10X (60 mM Tris-HCl, pH 7,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP 10% PEG) et 2 µl d'enzyme T4 DNA Ligase (Promega). Ce mélange réactionnel est laissé toute la nuit à une température de 15 °C. Les vecteurs utilisés dans le cadre de cette thèse pour la ligature d'extrémités à bords cohésifs sont le puc18 (Promega) et pEGFP-1 (Clontech).

### **2) Transformation bactérienne**

Les bactéries dites compétentes ont subi un certain nombre de traitements chimiques qui les rendent aptes à internaliser un acide nucléique étranger. Une suspension bactérienne est décongelée et incubée dans la glace 30 min en présence de 2 à 5 µl d'un mélange de ligature. Le choc thermique s'effectue à 42°C pendant 45 s ou à 37°C pendant 20 s selon la souche bactérienne utilisée, JM109

(Promega) ou DH5 $\alpha$  (Invitrogen) respectivement. Puis les bactéries sont de nouveau placées dans la glace 3 min. Du milieu LB (250  $\mu$ L) est ajouté à la suspension, et le mélange est incubé 1 h à 37°C sous agitation (250 rpm). La totalité de la suspension est alors étalée sur un milieu de culture LB supplémenté en antibiotique adéquat (Ampicilline 100  $\mu$ g/mL ou Kanamycine 34  $\mu$ g/mL), et incubée à 37°C pendant 12 h.

## F. Hybridation moléculaire

### **1) Migration et transfert sur membrane de fragments d'ADN : Southern Blot**

Après électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% (Tampon TBE), le gel est plongé deux fois dans un bain de soude 0,4 N et de NaCl 1 M pendant 15 min afin de dénaturer l'ADN. Les fragments digérés d'ADN génomique ou de BAC sont ensuite transférés sur une membrane de Nylon de type Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) par transfert passif par capillarité, pendant la nuit, dans une solution de soude 0,4 M. La membrane est ensuite rincée pendant 15 min avec une solution de Tris-HCl 0,5 M pH 5,2 et de NaCl 1 M afin de neutraliser la membrane et d'ôter toutes traces d'agarose qui pourraient subsister. Cette membrane est séchée quelques instants et l'ADN est fixé par irradiation UV (UV Stratalinker).

### **2) Migration et transfert sur membrane d'ARN : Northern Blot**

Après dénaturation (5min à 65 °C), les ARN sont séparés sur un gel d'agarose à 1,2 % réalisée avec de l'eau DEPC (Diéthyl pyrocarbonate) et contenant 1X de MOPS (Morpholinopropanesulphonic acid), 0,6 % de Formaldéhyde et 10  $\mu$ g de Bet final. Après électrophorèse, le gel est plongé successivement dans un bain d'H<sub>2</sub>O DEPC et de SSC 10X. Les ARN sont ensuite transférés sur une membrane de Nylon de type Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham) par transfert passif par capillarité pendant la nuit dans une solution de SSC 10X. La membrane est rincée dans une solution de SSC 2X avant fixation des ARN par irradiation aux UV (UV Stratalinker).

### **3) Hybridation d'une sonde d'ADN radiomarquée**

#### *a) Marquage de la sonde*

Le kit « Random Primers DNA Labelling System » (Life Technologies) a été utilisé pour le

marquage radioactif des fragments d'ADN. Cette méthode est valable pour des fragments de plus de 50 nucléotides et permet de marquer 25 ng d'ADN avec une activité spécifique d'environ  $10^9$  dpm/ $\mu$ g. Les fragments d'ADN utilisés pour le marquage (25 à 50 ng dans un volume inférieur à 25  $\mu$ l) sont dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 min. Le fragment dénaturé est mis en présence d'un mélange d'héxanucléotides (15  $\mu$ l) présentant des séquences aléatoires qui s'hybrident au hasard sur chacun des brins. Ces oligonucléotides hybridés servent d'amorces pour la synthèse d'un brin d'ADN par le fragment de Klenow qui incorpore les désoxynucléotides (0,4 mM final) incorporés dans le milieu. L'incorporation du  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (2,5  $\mu$ l soit 2,5  $\mu$ Ci au final) permet le marquage radioactif de l'ADN synthétisé. Après incubation de 1 h à 25°C et dénaturation de la sonde, le  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  non incorporé est éliminé par purification grâce au kit « Micro Bio-Spin P30 Tris Chromatography Columns » (Biorad).

#### *b) Hybridation de la sonde, lavages et révélation*

L'hybridation est réalisée dans un four à hybridation rotatif (Appligène). Au cours d'une première étape de préhybridation, la membrane est mise en contact avec un volume adéquat (0,75  $\mu$ l de solution/cm<sup>2</sup> de membrane) de solution d'hybridation commerciale ExpressHyb Hybridization Solution (BD Biosciences Clontech) pendant 2h à une température entre 42 et 65°C, dépendant de la stringence désirée. Durant la deuxième étape, constituant l'hybridation, la sonde marquée est ajoutée au tampon d'hybridation et l'incubation est prolongée pendant au moins 2h. Puis au cours de l'étape de lavage, l'excès de sonde et la sonde hybridée de manière non spécifique sont éliminées par des lavages de force ionique décroissante dans des solutions obtenues par dilution d'une solution de SSC 2X (citrate de sodium 0,03 M, NaCl 0,3 M, pH 7,0). Enfin durant l'étape de révélation, la membrane est enveloppée dans un film plastique et mise en contact avec un film autoradiographique (Hyperfilm MP X-ray, Amersham) à -80°C avec des écrans intensificateurs (Hyperscreen, Amersham) de 2 à 24 heures environ en fonction de l'intensité du marquage radioactif. Si nécessaire les rinçages peuvent être poursuivis ou la membrane peut-être déshybridée par un lavage en SDS 1% à 80°C deux fois 2 min. La membrane peut alors être hybridée avec une nouvelle sonde.

## G. Séquençage

### 1) Séquençage selon la méthode de Sanger

Les séquences de fragments d'ADN sont déterminées selon la technique de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les réactions de séquençage de produits de PCR purifiés après séparation sur gel d'agarose ou d'ADN plasmidique purifiés, sont menées grâce à l'utilisation d'une enzyme thermostable. Elles nécessitent 200 à 400 ng de matrice, un mélange réactionnel commercial (Terminator Ready Mix, PRISM Ready Reaction Ampli *Taq* FS, Perkin Elmer) contenant les dNTPs, les ddNTPs, le  $MgCl_2$  et l'ADN polymérase (*Taq* FS), ainsi que 15 pmol d'amorce. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation à 96°C pendant 10s, hybridation de l'amorce à 55°C pendant 5s et élongation à 60°C pendant 4 min. L'ADN néosynthétisé est précipité et lavé par 80  $\mu$ l et 250  $\mu$ l d'isopropanol 75%, respectivement, afin d'éliminer les réactifs non utilisés qui pourraient perturber la migration. Le culot d'ADN est ensuite séché et repris dans 20  $\mu$ l de TSR (Template Sequencing Reagent) avant d'être dénaturé par traitement thermique à 96°C pendant 5min. Les produits sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems)

### 2) Séquençage direct sur BAC

Après purification de l'ADN de BAC (voir II.A.2), une digestion sur la nuit de l'ADN de BAC par l'enzyme de restriction EcoRV est réalisée et les fragments d'ADN obtenus sont purifiés avec le kit QIAEX II (QIAGEN). L'ADN est ensuite précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 volumes d'éthanol 95% pendant 30 min à -20°C, et centrifugé à 4°C à 13000 g pendant 20 min. Le culot est lavé avec 500  $\mu$ l d'éthanol à 70%, puis séché et repris dans 10  $\mu$ l d' $H_2O$  stérile. Pour la réaction de séquençage, 5  $\mu$ l de la solution contenant les fragments de BAC sont mélangés avec 8  $\mu$ l de mélange réactionnel (Terminator Ready Mix, PRISM Ready Reaction Ampli *Taq* FS, Perkin Elmer) et 15 pmol d'amorce. Le programme d'amplification est le suivant : dénaturation à 96°C pendant 30 s, hybridation de l'amorce à 50°C pendant 10 s et élongation à 60°C pendant 4 min. L'ADN ainsi néosynthétisé est ensuite précipité et lavé comme décrit dans le paragraphe précédent.

## H. Recherche de polymorphismes de type SNP par la technique SSCP

La technique SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est basée sur l'analyse du changement de mobilité électrophorétique de l'ADN simple brin, qui est lié à des modifications de la structure secondaire ou tertiaire de l'ADN en cas de mutation. La mobilité électrophorétique de fragments d'ADN issus d'individus différents est comparée. L'existence d'un ou plusieurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism) est vérifiée par séquençage des individus présentant un profil électrophorétique différent après coloration au nitrate d'argent.

Pour ces manipulations le kit « GeneGel SSCP Starter Kit » (Amersham Biosciences) est utilisé.

### **1) Préparation des échantillons et des standards.**

Les régions d'intérêt sont amplifiées par PCR de manière à ce que la taille des fragments résultants n'excède pas 500 pb. Les échantillons sont dilués dans du tampon de charge (4,75 ml de formamide, 0,125 ml 1% (p/v) de xylène cyanol, 0,125 ml 1% (p/v) de bleu de bromophénol) en proportion 1 : 1 et dénaturés 5 min à 95°C. Le marqueur de taille (Amersham Biosciences) de 100 pb est aussi dilué avec le tampon de charge et placé en regard des échantillons.

### **2) Electrophorèse et coloration au nitrate d'argent**

Le gel est réhydraté pendant 1 heure avec 15 ml d'un tampon adéquat (A, B ou C). Les échantillons et le marqueur de taille sont ensuite chargés dans les puits et la migration est réalisée grâce à un appareil d'électrophorèse nommé « GenePhor Electrophoresis Unit ». Les conditions de migration dépendent du tampon de réhydratation, du gel et des électrodes. Dans ce travail le tampon A été utilisé à chaque fois.

Conditions d'électrophorèse avec le tampon A :

	Température	voltage	courant	puissance	temps
Phase 1	5 – 25°C	90 V	6 mA	5 W	25 min
Phase 2	5 – 25°C	500 V	14 mA	10 W	50 min

La détection des brins d'ADN simple brin se fait par une imprégnation à l'argent réalisée avec le kit « PlusOne DNA Silver Staining » (Amersham Biosciences), selon les instructions du fabricant.

## I. Génotypage de microsatellite

Le principe du génotypage de microsatellite repose sur l'analyse de la taille d'un fragment amplifié grâce à des amorces, dont une est marquée par un fluorochrome, flanquants le motif microsatellite. La taille du produit d'amplification varie donc en fonction du nombre de répétitions, spécifique de chaque allèle. L'analyse est réalisée sur le séquenceur « ABI PRISM 310 Genetic Analyzer » (Applied Biosystems). Les fragments d'ADN marqués sont excités par un laser et émettent une fluorescence qui sera collectée par l'appareil. En fonction de l'intensité de fluorescence, le logiciel interprète et « positionne » un pic électrophorétique. La taille exacte du fragment est estimée par rapport aux différents pics du marqueur de taille, migrant en même temps que l'échantillon à analyser.

Dans le travail de thèse, le microsatellite a été amplifié par PCR « Touchdown » avec une amorce sens marquée avec le fluorochrome 6-FAM™ (longueur d'onde d'émission : 517 nm, longueur d'onde d'excitation : 494 nm) et une amorce anti-sens non marquée.

La première étape consiste en la constitution des matrices, permettant de calibrer l'appareil, à l'aide du kit « DS-30 Matrix Standard kit ». La seconde étape consiste en la préparation des échantillons. Pour cela, on prélève 1  $\mu$ l de chaque échantillon auquel sont ajoutés 12  $\mu$ l de Formamide Hi-di et 0,5  $\mu$ l de marqueur de taille GeneScan-500 LIZ® (Applied Biosystems). Ce marqueur de taille, couplé à un fluorochrome orange, permet d'estimer la taille des échantillons d'ADN de 50 à 500 pb. Il produit 9 pics électrophorétiques correspondants à des fragments d'ADN simple brin de 35 pb à 500 pb. Après dénaturation, chaque échantillon est analysé avec le système GeneScan ABIPrism® 310 (Applied Biosystems).

## J. Génotypage de SNP (Méthode Taqman®)

La réaction est réalisée à l'aide du kit « Taqman® 2X PCR Master Mix » (Applied Biosystems) et consiste en une amplification par PCR de la région d'intérêt. La particularité de cette réaction est la présence, en plus des amorces, de deux sondes, marquées en 5' par deux fluorochromes différents, reconnaissant chacune spécifiquement l'un des deux allèles au SNP d'intérêt. En 3' des sondes se trouve un « quencher » qui empêche l'émission de fluorescence. La polymérase en progressant va dégrader les sondes hybridées spécifiquement. L'absence du « quencher » à proximité du fluorochrome va permettre la libération de la fluorescence allèle-spécifique. Après la réaction d'amplification, l'intensité de fluorescence est mesurée par l'appareil « Taqman ® 7900

HT » (Applied Biosystems). Pour exemple, considérons les allèles 1 et 2 couplés aux fluorochromes rouge et bleu, respectivement. Dans le cas d'un individu homozygote pour l'allèle 1 ou l'allèle 2, on aura libération exclusivement de fluorescence rouge ou bleue, respectivement. Dans le cas d'un individu hétérozygote, il y aura une libération équivalente de fluorescence rouge et bleue.

### III. Méthodes relatives aux protéines

#### A. Préparation des échantillons protéiques

Les échantillons sont traités après conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'échantillon est broyé dans un appareil FastPrep® FP220A (Q-BIOgene) avec le kit FastRNA® Pro Green kit (Q-BIOgene). Le tampon d'extraction utilisé est composé de NaCl (0,1 M), Tris-HCl (10 mM, pH 7,6), EDTA (1 mM), SDS (1 %), ovomucoïd (200 mg/L) et leupeptine (12 mg/L). Le broyat est centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant est bouilli à  $96^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min et centrifugé à nouveau à 13 000 rpm pendant 15 min et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant est récupéré et dosé.

#### B. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé grâce à la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le « BIO-RAD assay dye reagent » (BIO-RAD). Le standard utilisé pour le dosage est la BSA (Albumine Sérique Bovine).

#### C. Electrophorèse en gel Tris-Glycine

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS/PAGE) permet la séparation des protéines essentiellement en fonction de leur taille. Les gels utilisés dans le cadre de la thèse sont à 7,5 %.

Composition du gel de séparation :		Composition du gel de concentration :	
- eau :	4,1 ml	- eau :	1,9 ml
- acrylamide 40 % :	1,4 ml	- acrylamide 40 % :	250 $\mu$ l
- Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) :	1,875 ml	- Tris-HCl 1 M (pH 6,8) :	315 $\mu$ l
- SDS 20 % :	75 $\mu$ l	- SDS 20 % :	12,5 $\mu$ l
- APS 10 % :	50 $\mu$ l	- APS 10 % :	25 $\mu$ l
- TEMED :	5 $\mu$ l	- TEMED :	2,5 $\mu$ l

Le gel de séparation, dont la polymérisation commence dès l'addition de l'APS et du TEMED, est coulé entre deux plaques de verre et recouvert d'isobutanol saturé en eau. Ceci permet d'assurer la planéité et d'empêcher le contact avec l'air qui inhibe la polymérisation. Dès que la polymérisation est complète, l'isobutanol est éliminé et la surface du gel est rincée. Le gel de concentration est alors coulé et surmonté d'un peigne. Avant d'être déposés dans les puits ainsi formés, les échantillons protéiques dilués dans du tampon d'échantillon sont dénaturés. La migration s'effectue à 20 mA dans un tampon approprié.

## D. Analyse des protéines par immunodétection : Western blot

### 1) *Transfert actif sur membrane de nitrocellulose*

Après séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE, le gel est démoulé et placé sur une membrane de nitrocellulose de type PVDF (Roche Diagnostics) préalablement traitée selon les instructions du fabricant. Trois papiers Whattman imbibé de tampon de transfert (Tris base 48mM, glycine 39 mM, SDS 1,3 mM et Méthanol 20 %) ont été placés sous la membrane et sur le gel. Le transfert est réalisé sous un courant de 200 mA pendant 45 min. Après le transfert, la membrane est colorée au rougeponceau afin de vérifier que les protéines ont été correctement transférées, puis elle est abondamment rincée à l'H<sub>2</sub>O.

### 2) *Hybridation des anticorps et lavages*

La membrane est saturée dans une solution de Western Blocking Reagent (Roche Diagnostics) à 1 % pendant 4 à 6 h à température ambiante sous agitation. L'hybridation de l'anticorps primaire, dilué à une concentration adéquate dans du Western Blocking Reagent à 0,5 %, est conduite pendant toute une nuit à 4 °C. Après deux lavages au TBST (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM,

Tween 20 0,1 %, pH 7,5) et deux autres au Western Blocking Reagent à 0,5 % pendant 10 min, l'anticorps secondaire, dilué dans du Western Blocking Reagent à 0,5 %, est incubé pendant 45 min à température ambiante et sous agitation. Enfin, la membrane est lavée 4 fois avec du TBST pendant 15 min à température ambiante et sous agitation.

### **3) Révélation**

La révélation est réalisée grâce au kit BM Cheminluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Diagnostics), selon les instructions du fabricant. Ce réactif contient du luminol et du peroxyde d'hydrogène. Sous l'effet de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire, le luminol est oxydé en présence d' $H_2O_2$ . Le produit ainsi formé émet de la lumière au niveau de la bande protéique d'intérêt. Ce « spot » impressionne, après un temps variable selon l'intensité émise, un film autoradiographique.

## **IV. Méthodes relatives aux cellules**

La transfection transitoire ainsi que l'analyse par cytométrie de flux ont été utilisées pour déterminer l'activité promotrice de certaines régions du gène d'intérêt. Les lignées cellulaires sont transfectées par une construction présentant la région du gène à étudier en amont d'un gène rapporteur codant l'EGFP.

### **A. Transfections transitoires**

La culture cellulaire est réalisée dans les conditions standards dans un incubateur à 37 °C et avec 5 % de  $CO_2$ . Les cellules COS7 sont mise en culture dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complété avec 20 % de sérum de veau foetal (FCS), 2 mM de L-glutamine, 1 X d'acides aminés non essentiels, 50 U/ml de pénicilline et 50  $\mu g/ml$  de streptomycine (Eurobio). Les cellules C2C12, quant à elles, sont cultivées dans un milieu DMEM supplémenté avec 10 % de FSC, 2 mM de L-glutamine, 50 U/ml de pénicilline et 50  $\mu g/ml$  de streptomycine. Les cellules COS7 et C2C12 sontensemencées sur des boîtes de 100 mm de diamètre à une densité de  $9 \times 10^5$  et  $7,5 \times 10^5$ , respectivement, 18 h avant d'être transfectées avec 10  $\mu g$  d'ADN. 25 et 35  $\mu l$  d'agent de transfection, « Polyfect Transfectin Reagent » (Qiagen), ont été utilisés pour les COS7 et les C2C12, respectivement. La quantité d'agent transfectant et d'ADN ainsi que la densité des cellules avant transfection ont été déterminées par des expériences d'optimisation de la transfection. Les

cellules sont récoltées 48 h après la transfection dans 3 ml de tampon PBS contenant 15  $\mu\text{g/ml}$  d'iodure de propidium.

## B. Analyse par cytométrie de flux

Les analyses ont été réalisées sur un appareil FACS Vantage (Becton-Dickinson) équipé d'un laser argon (488 nm). La fluorescence verte de l'EGFP et rouge de l'iodure de propidium (IP) sont collectées avec des filtres band-passante de 530(30) nm et de 610 nm, respectivement. Un cytogramme de diffusion de la lumière à angle droit (SSC) et à petit angle (FSC) permet l'élimination des débris et des agrégats, les paramètres FSC et SSC étant corrélés à la taille et à la structure des cellules, respectivement. L'analyse des résultats se présente sous forme d'un cytogramme représentant la fluorescence verte (EGFP) en fonction de la fluorescence rouge (IP) avec des échelles logarithmiques. 20 000 événements d'intérêts, c'est-à-dire 20 000 cellules vivantes, sont inclus à chaque analyse.



# *Résultats*



Cette nouvelle partie concerne les résultats obtenus au cours du projet de thèse. Elle est scindée en trois chapitres, correspondant à trois articles. Les deux premiers constituent plus directement le volet fondamental du travail dont le but est de comprendre l'expression et la régulation du gène codant la calpastatine (*CAST*). Le dernier chapitre relève plutôt du volet finalisé dans le sens où la recherche des marqueurs génétiques qui permettraient de prédire la tendreté d'une viande, est évoquée. Chacun de ces trois articles sera résumé succinctement et remis dans son contexte.

## I. Structure et régulation du gène *CAST* bovin

### ***Introduction***

Lorsque j'ai débuté l'étude de la structure du gène et de ses régions promotrices, seules les structures complète murine et partielle porcine du gène de la calpastatine étaient disponibles (Parr *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2000). L'existence de quatre (Type I, II, III et IV) et trois (Type I, II et III) familles de transcrits différant par leurs extrémités 5' était également connu, respectivement chez la souris et le porc (Parr *et al.*, 2001; Takano *et al.*, 2000). Concernant les régions régulatrices, l'utilisation de souris transgéniques avait permis la mise en évidence de l'activité promotrice de la région murine en amont de l'exon 14T (Li et Goldberg, 2000) et la région en amont de l'exon 1xb bovin avait montré une activité promotrice (Cong *et al.*, 1998a; Cong *et al.*, 1998b). Aucune analyse complète des régions promotrices n'ayant jamais été réalisée chez le bovin ou une toute autre espèce, j'ai décidé d'établir la structure du gène *CAST* bovin et d'étudier les régions en amont des exons 1xa, 1xb, 1u et 14T.



## Résultats

En prenant appui sur les séquences disponibles, j'ai tout d'abord déterminé la structure putative du gène *CAST* humain. Ensuite, par comparaison entre la séquence d'ADNc bovin (N° accession : AF159246) et les séquences génomiques humaines, des amorces bovines ont pu être déterminées dans les exons putatifs bovins. Grâce à trois BAC bovins (CRB GADIE, INRA, Jouy-en-Josas), j'ai pu établir la structure du gène *CAST* bovin. Il est composé de 35 exons répartis sur, au moins, 130 kpb. Toutes les jonctions exons/introns répondent à la règle GT-AG (Shapiro et Senapathy, 1987). Le début des exons 1xa et 1u, 1xb et 14T, correspondant aux démarrages de transcription putatifs, ont été déterminés respectivement par analyse des banques d'EST, par « primer extension » (Cong *et al.*, 1998b) et par RACE-PCR.

Au cours de l'étude des régions régulatrices, l'existence de trois régions promotrices, en amont des exons 1xa, 1xb et 1u porcine, a été démontrée (Parr *et al.*, 2004), confortant l'hypothèse selon laquelle plusieurs régions promotrices dirigent l'expression du gène *CAST*. L'analyse que j'ai réalisée, par des expériences de transfections transitoires des régions en amont des exons 1xa, 1xb, 1u et 14T bovin placées devant un gène rapporteur (EGFP), a révélée l'existence de quatre promoteurs dirigeant l'expression des transcrits de Type I, II, III et IV. Un phénomène particulier a été observé concernant le promoteur 4. En effet, une augmentation d'activité promotrice a été associée à la délétion d'une région comprise entre les nucléotides -868 et -359 au niveau du promoteur 4. L'utilisation de constructions chimères suggère que cette séquence n'est pas inhibitrice, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas de sites de fixation de facteurs de transcription empêchant l'initiation de la transcription dans les cellules utilisées (COS7). Le rôle de cette région, pouvant être responsable de l'expression tissu-spécifique du transcrit de Type IV, sera discuté dans la partie discussion.



## II. Analyse de l'expression du gène *CAST* (ARNm et isoformes protéiques)

### ***Introduction***

Une fois l'existence des quatre types de transcrits établie chez le bovin, il convenait de déterminer leurs profils d'expression et leurs protéines correspondantes. De nombreuses isoformes protéiques de calpastatine ont été décrites, dans différentes espèces, au cours des dix dernières années (voir I. B. 5.). Même si, récemment une isoforme de 145 kDa a été assignée au produit de traduction du transcrit de Type I porcin (Parr *et al.*, 2004), aucune correspondance définitive n'a pu, à ce jour, être établie entre les différents types de transcrits de calpastatine observés et les isoformes protéiques identifiées, particulièrement chez le bovin.



## **Résultats**

Par RT-PCR et Northern blot, j'ai pu démontrer que les transcrits de Type I, II et III sont ubiquitaires alors que le Type IV est spécifique des testicules. L'épissage alternatif de l'exon 3 a été également révélé par RT-PCR. Une analyse par Northern blot, utilisant une sonde reconnaissant spécifiquement le transcrite de Type III, a permis de mettre en évidence l'association de l'extrémité 5' de Type III avec trois extrémités 3'UTR de longueurs différentes. Ce profil d'expression peut-être expliqué par l'existence de trois sites de polyadénylation différents (Cong *et al.*, 1998b) identifiés dans l'exon 30 bovin. Cette étude révèle l'existence de diverses combinaisons des extrémités 5' et 3' de calpastatine.

Dans le but d'établir une correspondance entre les transcrits et les isoformes observées par SDS-PAGE, une analyse par Western blot a été réalisée en utilisant un anticorps et plusieurs sérums dirigés contre différentes parties des protéines. Des bandes de 145, 125, 70 et 60 kDa sont révélées. La bande de 145 kDa correspond aux isoformes protéiques de Type I et II. Celles de 125 et 60 kDa pourraient être respectivement les produits de traduction des transcrits de Type III et IV. Quand à la bande observée à 70 kDa, elle pourrait avoir diverses origines. Elle pourrait être assignée à la forme érythrocytaire et/ou à un produit de protéolyse selon le sérum utilisé. L'origine de cette bande sera largement discutée dans la partie discussion.



### III. Analyse des polymorphismes du gène de la calpastatine

#### ***Introduction***

Malgré les nombreuses informations disponibles sur la calpastatine, peu de choses sont connues quant à son rôle dans la maturation de la viande. Comme déjà évoqué, la tendreté de la viande bovine est une qualité éminemment variable et l'un des moyens envisageables pour mieux maîtriser la durée nécessaire à la maturation d'une viande est d'identifier des marqueurs génétiques permettant de prédire la durée optimale de maturation. C'est pourquoi une recherche de polymorphismes sur le gène de la calpastatine bovine a été conduite.



## Résultats

Etant donné que le gène *CAST* comporte 35 exons répartis sur 130 kpb, il est apparu nécessaire de faire un choix quand aux régions à étudier en priorité pour la recherche de SNP. Mon choix s'est ainsi porté sur 12 exons et leurs bordures introniques (exons 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 22, 24, 25 et 27), correspondants aux sous-domaines A, B et C, présents dans les domaines I à IV, et responsables de l'inhibition des calpaïnes par la calpastatine. J'ai pu mettre en évidence sur le gène *CAST* plusieurs SNPs (14 au total) mais seulement un, situé à l'extrémité 3' de l'intron 8 (AY834771-nt239), a été plus largement étudié. De plus, en étudiant la partie 3' UTR, un autre SNP a également été détecté à l'extrémité 3' de l'exon 30 (AY834775-nt3023). Ces deux nouveaux SNPs, ainsi que deux autres, situés à l'extrémité 5' de l'exon 30 (AY834775-nt1650 et AY834775-nt1707) (Barendse, 2002), et qu'un microsatellite, situé à l'extrémité 5' du gène (Nonneman *et al.*, 1999), ont été génotypés dans une population composée de 82 individus Charolais issus d'un troupeau expérimental de l'INRA (Domaine de Galles, Avord).

Un des SNP issus du brevet (AY834775-1707) n'est pas polymorphe dans la population étudiée. Dix allèles ont été identifiés pour le microsatellite. Cinq haplotypes parmi les 8 combinaisons possibles ont été identifiés (GAA, AGG, AAG, GAG et GGG). L'analyse des haplotypes incluant le microsatellite a révélé l'existence d'au moins 12 combinaisons, les deux plus fréquentes dans la population étudiée étant 272-GAA et 276-GAA.



# *Discussion & perspectives*



L'objectif de ce travail de thèse était, d'une part, de mieux comprendre comment s'exprime et comment est régulé le gène codant la calpastatine et, d'autre part, de déterminer des marqueurs génétiques liés à la tendreté de la viande. Il s'agissait d'acquérir des connaissances afin de mieux comprendre et/ou tenter d'expliquer la variabilité observée dans les vitesses de maturation des viandes conduisant, au final, à l'inconsistance de la tendreté. Ce projet de thèse a donc conduit à l'établissement de la structure du gène *CAST* bovin, à la détermination des régions promotrices et des profils d'expression des quatre familles de transcrits, à l'identification des isoformes protéiques et de leur correspondance avec les transcrits et enfin à la détermination d'haplotypes.

La structure du gène bovin comporte 35 exons répartis sur, au moins 130 kpb alors que le gène murin, comportant également 35 exons, est réparti sur 114 kpb. Le gène humain, disponible dans les banques de données, ne présente pas les exons 1xa, 1xb, 1y et 1z et est réparti sur environ 80 kpb. Le découpage exons/introns est conservé entre les gènes bovin, murin et humain alors que les tailles des introns peuvent être différentes. Concernant la structure partielle porcine, les jonctions exons/introns sont conservées. Toutefois, n'ayant pas réussi à déterminer les tailles des introns bovins en 5', nous ne pouvons pas les comparer avec les tailles des introns porcins. Comme cela a été déterminé chez l'homme ou la souris (Goll *et al.*, 2003), les frontières des domaines inhibiteurs sont conservées : les domaines I, II et III correspondent à la traduction de 5 exons et le domaine IV à la traduction de 6 exons.

J'ai pu déterminer que les régions en amont des exons 1xa, 1xb, 1u et 14T ont une activité promotrice responsable de l'expression des transcrits de Type I, II, III et IV, respectivement. Trois constructions par promoteurs ont été réalisées afin d'estimer le rôle des facteurs de transcription, pour lesquels des sites de fixations potentiels ont été identifiés. Les constructions Prt1/3, Prt2/3 et Prt3/3, conservant une activité promotrice après transfections, présentent 1, 2 et 4 sites de fixations de l'élément Sp-1, respectivement. De plus, un îlot CpG a été identifié dans Prt3/3. Ces motifs ont précédemment été décrits lors des études des régions promotrices chez le bovin (Cong *et al.*, 1998b) et le porc (Parr *et al.*, 2004). Ces motifs sont caractéristiques des gènes de ménages et sont reconnus comme pouvant activer la transcription en absence de boîtes TATA. La délétion des nucléotides -579 à -320 du promoteur 1 (Prt1/1 à Prt1/2) entraîne une diminution de l'activité promotrice, pouvant être due à la disparition du microsatellite de répétition CA ou des différents éléments de fixation de facteurs de transcription tels que SRY, GATA-1, GATA-2 et AP-1. En revanche, chez le porc, la suppression du microsatellite révèle une augmentation de l'activité promotrice dans les lignées

cellulaires HEK293 et L6G8 (Parr *et al.*, 2004). La construction Prt2/2 comprend 1, 2 et 9 sites de fixation potentiels des facteurs AP-1, GATA-1 et Sp-1, respectivement. Toutefois, seulement 3 et 4 sites Sp-1 ont été décrits respectivement chez le porc (Parr *et al.*, 2004) et le bovin (Cong *et al.*, 1998a). L'augmentation du nombre de sites Sp-1 potentiels est due à une séquence présentant 80 % de nucléotides G qui n'avaient pas été décrite précédemment chez le bovin (Cong *et al.*, 1998a; Cong *et al.*, 1998b). La présence de cette séquence a été confirmée chez des individus de différentes races. Dans notre étude, il semblerait que les 7 sites Sp-1 potentiels situés dans la construction Prt2/2 soient responsables d'une partie mais pas de la totalité de l'activité transcriptionnelle, du fait de l'activité promotrice de la construction Prt2/3. Concernant le promoteur 3, le « core » promoteur est situé dans l'exon non traduit, 1u, dans lequel ont été identifiés 4 sites de fixation potentiels de Sp-1 dans un îlot CpG. La présence de 8 sites de fixation au facteur CdxA dans le promoteur 3 est à signaler. Cet élément est une protéine à homéodomaine de type caudal découverte chez le poulet (Margalit *et al.*, 1993). L'existence de ce facteur de transcription reste à prouver dans les autres espèces.

Au cours de l'étude des régions promotrices de *CAST*, une particularité a été observée pour le promoteur 4. En effet, toutes les constructions étudiées sauf une, Prt4/1, présentent une activité supérieure au contrôle. Etant donné, le caractère tissu-spécifique arboré par le transcrit de Type IV et la démonstration, réalisée chez la souris, que la région en amont de l'exon 14T dirige une expression spécifique des testicules (Li et Goldberg, 2000), il semble logique que cette région ne présente pas d'activité promotrice dans les lignées cellulaires utilisées dans notre étude (cellules de reins de singe et myoblastes de souris). Par opposition au résultat observé pour Prt4/1, la construction Prt4/2 présente une activité statistiquement significativement supérieure au contrôle, suggérant la présence d'éléments de fixation de facteurs de transcription dirigeant une expression spécifique des testicules dans la séquence comprise entre les nucléotides -868 et -359. Deux hypothèses étaient possibles : soit des facteurs de transcription, se fixant sur cette séquence, empêchent l'initiation de la transcription dans le tissu non-adéquat, soit des facteurs de transcription, présents uniquement dans les cellules de type spermatides, sont nécessaires à l'initiation de la transcription tissu-spécifique. Afin de discriminer ces deux hypothèses, des constructions chimères ont été réalisées et aucune différence dans l'activité transcriptionnelle n'a été observée entre les constructions présentant ou pas la région supposée régulatrice. Ceci suggère que ce n'est pas un élément répresseur de l'initiation de la transcription, qui aurait annihilé, ou tout du moins modifié, l'activité transcriptionnelle des

constructions chimères, qui engendre la non-activité de Prt4/1. Il pourrait donc s'agir d'un, ou plusieurs éléments activateurs de l'initiation de la transcription et qui serait présents uniquement dans les cellules de type spermatides. La séquence supposée régulatrice du promoteur 4 n'agit pas sur Prt2/2 et le promoteur CMV, dans les constructions chimères, car ces régions promotrices n'ont pas besoin d'éléments supplémentaires pour initier la transcription. Il peut bien évidemment être considéré que le mode de régulation utilisé dans le cas du promoteur 4 peut-être beaucoup plus complexe et non décrit à ce jour. Les cellules spermatogéniques expriment un grand nombre de transcrits spécifiques. Ils peuvent être contrôlés par une régulation transcriptionnelle complexe dirigée par des facteurs de transcription classiques et spécifiques (Dadoune *et al.*, 2004). Cette spécificité peut-être aussi due à l'existence de gènes spécifiques des cellules haploïdes, généralement générés par rétrotransposition ou duplication d'un gène original (Ike *et al.*, 2002), à la génération de transcrits spécifiques des testicules par le phénomène d'épissage alternatif (Behr et Weinbauer, 2001), ou encore à la transcription à partir d'un promoteur spécifique des cellules haploïdes (Howard *et al.*, 1993). Des promoteurs spécifiques des testicules ont été décrits pour un certains nombres de gènes parmi lesquels ceux codant la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale, *mGPDH* (Rajkovic *et al.*, 2004), et l'angiotensine convertase, *ACE* (Langford *et al.*, 1991). Dans ces deux cas, comme pour le gène *CAST*, les gènes présentent plusieurs promoteurs somatiques et un spécifique des testicules, situé dans un intron, et dirigeant l'expression d'un transcrit plus court codant l'isoforme protéique spécifique des testicules. En supposant que les promoteurs testiculaires des gènes *ACE* et *CAST* sont sujets à une régulation similaire, nous avons comparés les séquences de ces régions chez l'homme et de *CAST* chez le bovin. Cette comparaison conduit à l'identification d'une séquence conservée de 10 nucléotides (-382 to -371 nt) présentant une partie d'un site de fixation au facteur de transcription MOK2, une ribonucléoprotéine associée à un doigt de zinc. Ce facteur de transcription est préférentiellement exprimé dans le cerveau et les testicules. Deux gènes cibles potentiels de ce facteur de transcription ont été d'ores et déjà identifiés, le gène *PAX3* humain, facteur de transcription exprimé lors du développement du cerveau, et le gène *IRBP* humain, intervenant dans la vision. Le facteur MOK2 peut agir au niveau du promoteur distal ou du « core » promoteur, il peut également être un activateur ou un inhibiteur selon le contexte physiologique (Arranz *et al.*, 2001). La comparaison entre les séquences humaines et bovines, en amont de l'exon 14T de *CAST*, révèle à nouveau des régions conservées parmi lesquelles une longue séquence de 52 nucléotides (-806 to -755 nt) et une séquence de 8 nucléotides

(-592 to -585 nt). La région bovine de 52 nucléotides présente à nouveau une partie d'un site de fixation du facteur MOK2. De plus, un site de fixation du dimère FXF/RXR est détecté. FXR et RXR sont des récepteurs aux hormones nucléaires agissant comme des facteurs de transcription, après fixation du ligand. La seconde région, de 8 nucléotides, contient un site de fixation d'une protéine à homéoboite, MEIS1. Ce facteur est impliqué dans les structures segmentées au cours du développement. Une étude récente a fourni des données sur l'expression testiculaire de MEIS1 et son rôle dans la maintenance de la structure segmentée du testicule (Bomgardner *et al.*, 2003). Tous ces facteurs pourraient agir seuls ou ensemble pour activer la transcription dans les testicules. Il est à noter également la présence de 2 éléments CRE-like, connu pour fixer le facteur CREMt (cAMP-response-element modulator tau), spécifique des testicules. Ce facteur a été impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène *mGPDH* avec le répresseur spécifique des testicules GCNF (Rajkovic *et al.*, 2004). Toutefois, étant donné qu'aucun élément de fixation de type CRE-like n'est observé entre les nucléotides -868 et -359, la présence de cet activateur ne semble pas nécessaire à l'expression spécifique des testicules du promoteur 4. Pour déterminer plus précisément le rôle des sites de fixation pour les facteurs de transcription identifiés, l'étude pourrait être prolongée par l'analyse de nouvelles constructions par transfections transitoires. Des études par mutagenèse dirigée permettraient de préciser le rôle de chacun de ces facteurs. En absence de lignée cellulaire spécifique des testicules, l'étude du promoteur 4 et de sa régulation pourrait se poursuivre par mutagenèse et transgenèse chez la souris. L'utilisation de souris transgéniques pourrait apporter également des informations supplémentaires et non négligeables quant à la spécificité tissulaire de chacun des promoteurs.

Par RT-PCR, nous avons pu démontrer que les transcrits de Type I, II et III semblaient être ubiquitaires alors que le transcrit de Type IV est spécifique des testicules. La perspective d'une quantification des transcrits de Type I, II et III conduirait à une détermination plus précise des profils d'expression dans chaque tissu. En effet, il semble évident que chacun d'entre eux puisse avoir un rôle particulier dans la cellule, notamment par la production d'isoformes protéiques particulières. Nous avons également observé que l'exon 3 était sujet au phénomène d'épissage alternatif comme chez l'homme (Lee *et al.*, 1992a), le porc (Parr *et al.*, 2001) et la souris (Takano *et al.*, 1999; Takano *et al.*, 2000). Cependant, nous n'avons pas réussi à définir une règle concernant la présence de l'exon 3 dans les transcrits de Type I, II et III, semblant présenter les formes avec et sans l'exon 3 dans la majorité des tissus. Ceci suggère que les différences entre tissus seraient quantitatives plutôt que

qualitatives renforçant l'idée qu'une quantification est nécessaire.

Par Northern blot, un profil à trois bandes d'environ 4,5, 3,5 et 2,6 kb a été mis en évidence dans tous les tissus testés excepté dans les testicules où une bande supplémentaire de 1,6 kb est observée. Grâce à l'utilisation d'une sonde spécifique du transcrite de type III, nous avons montré que l'exon 1u pouvait être associé à trois extrémités 3' UTR différentes issues de l'utilisation de trois sites de polyadénylation différents (Cong *et al.*, 1998b). L'existence de multiples sites de polyadénylation avaient déjà été décrites chez le lapin (Emori *et al.*, 1987). En considérant les tailles calculées des transcrits, la bande de 1,6 kb présente uniquement dans les testicules correspondrait au transcrite de Type IV associé à l'extrémité 3'UTR la plus courte. Des analyses similaires utilisant des sondes correspondant aux exons 1xa et 1xb se sont révélées infructueuses, même avec 1 µg d'ARNm, suggérant un taux d'expression plus important du transcrite de Type III. Cette hypothèse nécessiterait elle aussi une vérification par une étude quantitative. L'utilisation de sondes reconnaissant tous les types de transcrits avaient montré un profil similaire dans le cœur (Cong *et al.*, 1998b) et le muscle squelettique *Longissimus Dorsi* bovin (Parr *et al.*, 1992). Néanmoins, une analyse par Northern blot sur des ARN de cœur et de muscle squelettique porcine affiche des bandes d'environ 5,8 et 3,2 kb dans le cœur, et 5,4 et 2,8 kb dans le muscle (Parr *et al.*, 2000; Parr *et al.*, 2001). Sachant que les extrémités 5' des transcrits porcine sont similaires aux extrémités 5' bovines, les différences de taille entre bovin et porc sont probablement dues à des extrémités 3' UTR de longueurs différentes. Etant donné que seulement deux bandes sont observées chez le porc, on peut également supposer qu'il existe un site de polyadénylation en moins.

Toutes ces données confirment qu'en plus des 4 extrémités 5', les transcrits de calpastatine présentent aussi 3 extrémités 3' UTR de longueurs différentes, conduisant à des combinaisons multiples des extrémités 5' et 3'. La détermination des associations préférentielles entre les extrémités 5' et 3' sera à approfondir mais cette question est rendue difficile compte tenu du fait que l'extrémité 3' UTR la plus longue contient également les séquences des extrémités dites courtes et moyennes. Ainsi, il semble ardu de discriminer les extrémités 3' les unes des autres. Une solution serait d'utiliser la méthode de 3' RACE-PCR grâce à une amorce spécifique d'une extrémité 5'. J'ai testé ce type d'expérimentation, sans succès. Il apparaîtrait que la taille de l'amplification est un élément limitant. La présence de plusieurs sites de polyadénylation suggère une régulation de la stabilité des ARNm et une régulation traductionnelle. Le rôle des divers transcrits restera à déterminer. En effet, de nombreuses études, utilisant la méthode RNAi ou des souris transgéniques, ont été conduites

dans le but de déterminer le rôle du système calpaïnes/calpastatine dans certains types cellulaires et/ou conditions physiologiques. Toutefois, ce type d'étude ne discrimine pas les différents types de transcrits de calpastatine. Il semblerait donc intéressant à l'avenir d'étudier les conséquences de la sur-expression des transcrits de Type I, II, III et IV séparément, sur la physiologie d'une souris.

L'existence de 4 types de transcrits de calpastatine conduit inéluctablement vers l'hypothèse que 4 isoformes protéiques leur correspondent. L'utilisation de différents anticorps et sérums dirigés soit contre les parties communes à toutes les isoformes protéiques putatives, soit contre des parties spécifiques de chacune d'entre elles, a permis d'établir une correspondance entre isoformes observées et les transcrits de Type I, II et III. Les protéines de Type I et II correspondent à une forme migrant à 145 kDa sur un gel SDS-PAGE. La forme de Type III, quant à elle, coïnciderait avec une bande à 125 kDa. Des bandes de tailles similaires ont, d'ores et déjà, été décrites chez le bovin (Cong *et al.*, 1998b; Geesink *et al.*, 1998). Une forme de 70 kDa est révélée par un sérum dirigé contre le domaine IV. Elle peut correspondre à un produit C-terminal de protéolyse ou à la forme érythrocytaire. En effet, une forme spécifique des érythrocytes, ayant une taille calculée de 47 kDa, a été décrite comme migrant à 70 kDa sur un gel SDS-PAGE (Takano et Murachi, 1982). L'anticorps Anti-DomIV, dirigé contre le domaine IV, met en évidence une forme à 60 kDa dans un homogénat testiculaire. La détection de cette bande, uniquement dans les testicules, suggère qu'il s'agirait du produit de traduction du transcrit de Type IV. Cette isoforme de Type IV a une taille calculée quasi-identique à celle de la forme érythrocytaire, suggérant une migration similaire sur SDS-PAGE, soit 70 kDa. Toutefois, les 40 premiers acides aminés des deux isoformes protéiques étant de compositions différentes, il est possible que la forme de Type IV n'ait pas le même comportement que la forme érythrocytaire sur un gel SDS-PAGE.

Une forme migrant à 70 kDa est également détectée avec les sérums Anti-Ex1xa, Anti-Ex1xb et Anti-DomXL. Cette isoforme ne peut pas correspondre à la forme érythrocytaire, connue pour migrer à cette taille sur SDS-PAGE, puisque aucun sérum utilisé ne peut reconnaître cette isoforme ne contenant que les domaines II, III et IV. Cette isoforme peut avoir diverses origines : elle peut migrer « normalement » c'est-à-dire à sa taille calculée, ou avoir subi des modifications post-traductionnelles telles qu'une glycosylation, une phosphorylation ou une protéolyse. Si l'hypothèse de la protéolyse est considérée, le clivage pourrait être spécifique et prendre place de manière à conserver intacts les épitopes N-terminaux reconnus par les sérums. Considérant les tailles calculées des protéines et le ratio décrit de 1,53 entre les tailles estimées sur gel SDS-PAGE

et celles calculées (Takano *et al.*, 1988), la forme de 70 kDa ne comporterait ni le domaine III, ni le IV. Un travail récent tentant de déterminer la séquence de clivage des calpaïnes, décrit une séquence consensus similaire à celle du sous-domaine B (Tompa *et al.*, 2004). Etant donné que les calpaïnes sont capables de dégrader la calpastatine (Doumit et Koochmaraie, 1999), le clivage peut se produire au niveau du sous-domaine B du domaine II, supprimant ainsi les domaines III et IV. Un clivage de ce type engendrerait la formation d'un produit C-terminal dont la taille calculée serait similaire à celle du produit N-terminal. Une telle forme pourrait correspondre à la forme de 70 kDa reconnue par l'anticorps Anti-DomIV et le sérum Anti-pep-DomIV. Nous devons considérer également que, si la forme à 70 kDa correspond à une protéine entière, migrant à sa taille calculée, alors elle serait également détectée par Anti-DomIV et Anti-pep-DomIV et les sérums dirigés contre les parties N-terminales des protéines. Ce n'est pas la première fois qu'un produit de protéolyse de 70 kDa est décrit. En effet, une étude par Western blot utilisant le sérum Anti-Ex1xa sur un extrait de muscle squelettique porcin présente une bande d'environ 70 kDa (Parr *et al.*, 2004). Néanmoins, chez le bovin (Cong *et al.*, 1998b), une étude par Western blot n'a pas décrit ce type de bande. Dans cette étude, le sérum, dirigé contre la région XL, a été utilisé sur une fraction protéique après précipitation au sulfate d'ammonium, or il n'est pas exclu que la forme à 70 kDa ne soit pas présente dans cette fraction mais plutôt dans une autre. De plus, l'analyse d'un homogénat de cœur a été réalisée grâce à un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la calpastatine bovine. Ce type d'anticorps ne détecterait donc pas le produit de protéolyse N-terminal de 70 kDa mais devrait reconnaître le produit C-terminal. Or, il a été démontré que chaque domaine de calpastatine (I, II, III et IV) pouvait inhiber une molécule de calpaïne, le produit C-terminal de protéolyse pourrait donc être sujet à d'autres protéolyses spécifiques n'altérant pas sa capacité d'inhibition. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans certaines études, la forme de 70 kDa n'est pas détectée.

En revanche, il est surprenant qu'aucune bande à 70 kDa ne soit détectée par le sérum Anti-Ex3. En effet, le peptide correspondant est situé dans la partie N-terminale de la protéine et le sérum Anti-Ex3 devrait reconnaître le produit de protéolyse N-terminal putatif. L'absence de la bande à 70 kDa peut-être expliquée par une détection inefficace du sérum Anti-Ex3 ou par l'absence du peptide correspondant à l'exon 3 au niveau de la bande de 70 kDa, reconnue par les sérums Anti-Ex1xa, Anti-Ex1xb et Anti-DomXL. Cette absence pourrait être due au phénomène d'épissage alternatif auquel l'exon 3 est sujet. Etant donné que la séquence peptidique correspondant à l'exon 3 ne semble être présente qu'au niveau des protéines entières (bandes à 145 et 125 kDa), une hypothèse pourrait être

qu'elle « protège » la protéine contre la protéolyse spécifique conduisant à la formation de la forme de 70 kDa. En fait, le produit de traduction de l'exon 3 a été suggéré comme étant impliqué dans la fixation de la calpastatine à la membrane (Lee *et al.*, 1992a; Mellgren *et al.*, 1989). Cette localisation particulière de la calpastatine pourrait être responsable du rôle de protection, contre la protéolyse spécifique, attribuable à la séquence peptidique correspondant à l'exon 3. Cette hypothèse, pour être confirmée ou infirmée, pourrait être testée par une immunoprécipitation suivie d'une analyse par spectrométrie de masse afin de déterminer la présence ou l'absence de la séquence peptidique correspondant à l'exon 3. Les correspondances entre transcrits et protéines pourraient, entre autres, être confirmées par des expériences de transcription et traduction *in vitro*. La résolution des gels SDS-PAGE utilisés dans notre étude ne permet pas la discrimination des isoformes de Type I et II, ni des isoformes comportant ou non un exon particulier, comme l'exon 3. La combinaison d'une séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle et d'une analyse par immunodétection avec des sérums spécifiques de chaque isoforme permettrait sûrement l'obtention d'informations supplémentaires. Ce type de technique pourrait notamment déterminer si la bande de très forte intensité, autour de 145 kDa, que nous observons dans un homogénat de cœur bovin avec Antipep-DomIV, correspond à une ou plusieurs isoformes. D'autre part, l'existence d'isoformes différant dans leurs parties N-terminales suggère des rôles spécifiques à chaque isoforme. Différentes hypothèses peuvent être émises. Ces séquences pourraient spécifier une localisation subcellulaire particulière, avoir des partenaires protéiques autres que les calpaïnes et/ou une affinité différente pour celles-ci. Peu d'études se sont intéressées à ces extrémités N-terminales et différentes expérimentations sont envisageables. L'immunolocalisation cellulaire grâce aux anticorps spécifiques ainsi que l'utilisation de ces peptides couplés à une molécule fluorescente permettraient de préciser leur localisation cellulaire. L'identification de nouveaux partenaires de la calpastatine ainsi que l'interaction de ces domaines N-terminaux avec les calpaïnes pourrait être étudiées par UV cross-linking et grâce à des colonnes d'affinité présentant ces peptides.

Les polymorphismes que nous avons pu mettre en évidence au cours du travail de thèse, ainsi qu'un microsatellite et deux SNP déjà décrits, ont donc été génotypés chez 82 individus de race Charolaise. L'obtention d'un grand nombre d'haplotypes, 12 au total, alors que la population étudiée est assez restreinte suggère que les marqueurs décrits dans notre étude ne sont pas strictement associés. Ceci n'est pas vraiment surprenant si l'on considère la distance d'au moins 130 kpb séparant le microsatellite et le SNP AY834775-nt3023, qui sont cependant présents aux extrémités du gène

codant la calpastatine. Les animaux utilisés dans notre étude ont été phénotypés pour la tendreté de leur viande. Les premières études concernant la liaison entre génotype et tendreté ne semblent pas révéler de lien particulier. Une étude statistique est actuellement en cours pour déterminer plus précisément si une association existe entre les haplotypes observés et la variabilité de tendreté de la viande. L'un des SNP déjà décrit (AY834775-nt1707) n'est pas polymorphe dans notre population, seul l'allèle A étant observé. Or, il s'avère que la présence de l'allèle T est associée, dans le brevet (Barendse, 2002), à une viande tendre. Les populations utilisées dans l'étude australienne et dans la nôtre sont très différentes. En effet, aucun individu de race Charolais n'a été génotypé dans le cadre du brevet. De plus, seulement 2 individus hétérozygotes pour ce SNP ont été mis en évidence parmi les 250 animaux testés par cette équipe australienne. Il semblerait donc prudent d'accorder plus d'importance à l'autre SNP (AY834775-1650) décrit dans ce brevet. D'autre part, 13 et 10 allèles du microsatellite sont décrits respectivement dans le brevet et dans notre étude. Enfin, il est à noter que les marqueurs que j'ai utilisés sont actuellement génotypés, dans diverses races françaises et étrangères, dans le cadre de deux programmes s'intéressant à la qualité des viandes en général : le projet européen GeMQual et le projet Qualvigène soutenu par le programme national Agénac.

La recherche de marqueurs génétiques est à poursuivre, notamment dans les régions promotrices. Mais un point très important pour la poursuite de ce travail reste la disponibilité d'échantillons bovins. En effet, au cours de ce travail, nous disposions d'échantillons d'ADN provenant d'individus caractérisés pour leur tendreté. Cependant, actuellement, aucun échantillon de tissus, comme les muscles squelettiques, issus d'individus caractérisés pour leurs caractéristiques phénotypiques permettant des extractions d'ARN et/ou de protéines ne sont disponibles. En effet, il semblerait intéressant de déterminer, chez des individus présentant des vitesses de maturations très différentes, quels sont les transcrits et les isoformes protéiques présentes d'un point de vue qualitatif et quantitatif. Ce type d'analyse pourrait permettre de révéler de nouvelles pistes quant à la compréhension du phénomène de maturation des viandes.



## Conclusion

Les résultats obtenus apportent les bases de nouvelles connaissances sur le gène *CAST* bovin, son expression et sa régulation. Le gène codant la calpastatine se comporte comme une entité modulable engendrant une multitude de combinaisons de transcrits, et donc de protéines, tant au niveau des extrémités 5' et 3', qu'au niveau de la présence de certains exons. Chacune des isoformes produites pourrait avoir un rôle particulier dans l'activité inhibitrice de la calpastatine vis à vis des calpaïnes. On peut aisément imaginer que la présence de certaines séquences peptidiques, qu'ils s'agissent d'un exon ou des domaines L ou XL entiers, agirait sur l'affinité de la calpastatine pour la  $\mu$ - et/ou la m-calpaïne, sous certaines conditions physiologiques, permettant donc la réponse aux stimuli extérieurs conditionnant l'activité protéolytique des calpaïnes. Aujourd'hui, les conditions dans lesquelles les calpaïnes ubiquitaires sont actives sont encore floues. Etant donné la diversité de séquences présentée par les nombreuses isoformes protéiques de calpastatine, il semble évident que l'inhibiteur a une place primordiale dans la régulation du système calpaïne/calpastatine.

Depuis le dépôt d'un brevet liant des polymorphismes du gène *CAST* à la tendreté, on pourrait penser que le problème de la variabilité de la tendreté est réglé. Cependant, étant donné les races étudiées dans le cadre de ce brevet, il faut rester prudent tant que cette association n'est pas confirmée au sein des races européennes. De plus, les polymorphismes mis en évidence ne semblent pas être responsables du phénotype mais paraissent plutôt liés à une combinaison de séquences qui elles le sont. De plus, une recherche de QTL a permis de lier une région du génome contenant le gène de la  $\mu$ -calpaïne avec la tendreté. Dans ce cas également, des polymorphismes du gène *CAPN1* ont été liés à la tendreté. Quoiqu'il en soit, ces données supportent l'idée de l'implication du système calpaïne/calpastatine dans le processus de maturation. La protéolyse ménagée des fibres musculaires, conduisant à la tendreté finale, est un phénomène complexe n'impliquant sûrement pas exclusivement le système calpaïnes/calpastatine. Toutefois, à ce jour, le rôle de chaque système protéolytique, qu'il soit majeur ou secondaire, reste mal connu.

A la vue des données obtenues sur le gène codant la calpastatine bovine, nous pouvons nous interroger sur la poursuite du travail : doit-on rechercher le ou les polymorphismes causals puis étudier leurs conséquences, ou doit-on comprendre le fonctionnement de la calpastatine puis réaliser une recherche ciblée de polymorphismes ? Il est difficile de prédire quelle méthode apportera le plus rapidement possible la réponse à l'inconsistance de la tendreté. Si les séquences

promotrices avaient été connues au début de ce travail, la recherche de polymorphismes se serait orientée vers ces parties du gène, en particulier. L'attente des professionnels de la viande est un élément à prendre en considération. En effet, l'objectif des professionnels est une réduction des coûts et ils sont donc demandeurs, le plus rapidement possible, d'un test permettant de prédire le temps optimal de maturation d'une viande. Des projets de recherches de type systématique (recherche de QTL, analyses transcriptomique et protéomique) doivent être conduits conjointement avec des études de type gène candidat comme celle présentée ici. Ceci implique, par exemple, la recherche de polymorphismes dans les régions promotrices de CAST dans le cadre de projet à grande échelle, tels que GeMQual ou Qualvigène, mais aussi la prise en compte des différents transcrits de calpastatine dans les approches de type transcriptomique.

# *Nouveau chapitre de la thèse*



## I. Place et enjeux de la thèse

« Structure, régulation, expression et polymorphismes du gène CAST codant la calpastatine bovine. »

Tous les consommateurs de viande savent apprécier sa qualité. La qualité d'une viande est une propriété globale qui est la résultante de certains critères : tendreté, jutosité, teneur en gras intramusculaire, saveur, couleur du muscle...etc. La qualité idéale, recherchée par le plus grand nombre de consommateurs n'est ni unique ni fixe. Elle varie dans l'espace et dans le temps, d'une époque à une autre, d'un pays ou d'une région à l'autre. Par exemple les viandes présentant beaucoup de gras intramusculaire sont particulièrement prisées par les Japonais et très peu en Europe et notamment en France. Cependant, une caractéristique de la viande semble être recherchée par une majorité de consommateurs à notre époque : la tendreté.

Après l'abattage d'un animal, la carcasse est stockée à 4°C pour subir un phénomène naturel d'attendrissage de la viande que l'on appelle maturation. Durant cette maturation de la viande, une amélioration de la tendreté principalement due à un relâchement des fibres musculaires, ou myofibrilles, va se produire. Ce relâchement est la résultante de l'action d'enzymes, les protéases, coupant les myofibrilles. Cependant il existe une variabilité des temps de maturation optimum. En effet, certains morceaux de viande ne nécessitent que 3 jours alors que d'autres nécessitent plus de 14 jours pour atteindre une tendreté optimum. Ceci pose un problème économique résultant du coût du stockage des viandes. Cette variabilité a donc amené les acteurs économiques de la filière viande bovine à s'intéresser à l'élaboration de méthodes permettant de prédire quel est le temps optimum de maturation d'une viande.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à un gène d'inhibiteur de protéases, la calpastatine, qui inhibe spécifiquement des protéases appelées calpaines et qui semble être un des acteurs majeur de la maturation. L'identification d'une ou plusieurs mutations au niveau de la calpastatine expliquant la variabilité du phénomène permettrait le développement d'un test de prédiction du temps optimum de maturation d'une viande. Ce test autoriserait une baisse des coûts de production des viandes et, par conséquent, une baisse du prix de vente. Ceci permettrait à un plus grand nombre de consommateurs d'avoir accès à une viande de qualité, pour ce qui est de la tendreté. D'un point de vue fondamental, j'essaye de comprendre comment fonctionne ce gène

dans la cellule et plus particulièrement la cellule musculaire. La calpastatine étant potentiellement impliquée dans de nombreuses pathologies humaines, une meilleure compréhension de son fonctionnement, chez le bovin, permettrait l'ouverture de nouvelles pistes de recherche chez l'homme.

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'UMR 1061 INRA/Université de Limoges sur le site de la Faculté des Sciences et Techniques. Cette Unité de Génétique Moléculaire Animale est constituée de trois équipes : l'équipe « Glycogénome », l'équipe « Génomique et traçabilité » et l'équipe « Génomique et muscle ». Mon travail s'inscrit dans le cadre de cette dernière équipe. Plusieurs critères ont motivés mon choix d'effectuer mon DEA puis ma thèse au sein de ce laboratoire. Tout d'abord, le sujet a suscité mon intérêt. Ensuite, ce fut un défi puisque je fus seule à aborder ce sujet inscrit dans une thématique qui débutait au laboratoire. De plus, je pouvais avoir la possibilité d'enseigner ce qui me permettrait de préciser mon projet professionnel. Enfin, le laboratoire faisait partie de l'INRA qui est un grand organisme de recherche comme chacun sait, et il offrait des équipements nombreux et donc des possibilités d'apprentissage techniques divers.

Cependant, la qualité des viandes et notamment la tendreté est un sujet très prisé internationalement. Plusieurs pistes sont exploitées tant dans le domaine privé que public. L'étude du gène codant la calpastatine est une de ces pistes. Récemment, une équipe privée australienne a déposé un brevet liant des mutations dans le gène de la calpastatine à une viande plus ou moins tendre. Ces chercheurs sont actuellement en train de mettre en place un test de prédiction. D'autre part, en ce qui concerne un volet plus fondamental, une équipe anglaise travaille sur l'expression de la calpastatine chez le porc. Cette équipe effectue le même type d'études que moi mais plus rapidement, probablement parce que plus d'une personne travaillent sur le sujet.

## II. Gestion du projet et moyens mis en œuvre

A mon arrivée en DEA, comme je l'ai déjà indiqué, la thématique dans laquelle s'intégrait mon sujet venait de débiter et restait assez vague. Après avoir réalisé une étude bibliographique, un sujet plus défini a été mis en place. Une bourse cofinancée INRA/Région Limousin, un poste de moniteur ainsi qu'un poste d'ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche) au sein de la Faculté des Sciences et Techniques durant ma dernière année m'ont permis d'être financé durant ces quatre années.

Mon groupe de projet se constituait de mon directeur de thèse Hubert Levéziel, Directeur de recherche à l'INRA, ainsi que, à partir du milieu de la deuxième année, de ma co-directrice de thèse Valérie Amarger, Chargé de recherche à l'INRA. Ce groupe se réunissait plus ou moins régulièrement pour organiser, réorienter le projet mais également lorsque j'avais besoin de leurs conseils à tout point de vue. Même si je n'eus que deux interlocuteurs principaux, ils furent très disponibles. J'ai également pu bénéficier de l'aide technique plus ponctuelle d'une technicienne et deux ingénieurs ainsi que de celle des autres membres du laboratoire. Une ou deux fois par an j'ai eu l'occasion de présenter mon travail à tout le laboratoire ce qui m'a permis d'acquérir une certaine aisance pour la communication orale.

Le matériel utilisé a été principalement financé par l'INRA et l'Université de Limoges. Je disposais d'ailleurs de tous les moyens techniques disponibles au laboratoire pour mener mon projet. En effet, le laboratoire possède de nombreux équipements qui m'ont été très utiles. Aucun achat ne m'a d'ailleurs été refusé à partir du moment où il était justifié. Le tableau ci-dessous récapitule les dépenses directement associées au projet.

CATEGORIE	DEPENSES	
RESSOURCES HUMAINES	Salaires	62 000 €
	Encadrants	23 800 €
	Administration	10 000 €
	Permanents du laboratoire	600 €
	Ecole Doctorale	1 650 €
	<b>Sous-total</b>	<b>98 050 €</b>
MATERIELS	Consommables	45 000 €
	Equipement	2 000 €
	<b>Sous-total</b>	<b>47 000 €</b>
INFRASTRUCTURES	Amortissement des locaux et aménagement	15 000 €
	Frais d'entretien logistique et maintenance	5 000 €
	<b>Sous-total</b>	<b>20 000 €</b>
DOCUMENTATION		500 €
DEPLACEMENTS		4 820 €
<b>TOTAL</b>		<b>170 370 €</b>

Le coût de ma thèse s'élève à 170 370 €.

### III. Compétences développées dans le cadre du projet

Au cours de mon doctorat, j'ai développé des compétences techniques et scientifiques bien sur, mais j'ai évolué personnellement.

D'un point de vue scientifique je me suis appropriée le sujet. D'un point de vue plus technique, j'ai acquis des compétences importantes dans le domaine de la biologie moléculaire et de la biologie cellulaire. L'enseignement m'a permis de développer mes qualités pédagogiques et ce fut une expérience très enrichissante notamment lorsque j'eus l'occasion d'enseigner dans des domaines peu familiers.

Ces années m'ont permis d'améliorer ma connaissance des outils informatiques en général, ma capacité rédactionnelle, mon esprit d'analyse et de synthèse mais aussi mon esprit critique. Ma participation à des congrès nationaux ou internationaux m'a permis, au cours de communications écrites ou orales, d'acquiescer une certaine aisance en français comme en anglais. Par ailleurs, j'ai développé une combativité lorsqu'il a été question de participer à un congrès international au Japon. En effet, après avoir convaincu mon responsable de thèse que cette expérience était nécessaire pour ma thèse et mon projet professionnel, il a fallu trouver un financement et organiser ce voyage. Ma place de présidente d'une association de doctorants durant un an m'a appris la conduite et l'animation de réunions ainsi que la gestion d'une petite structure de personnes. Cette association faisait également partie d'une association nationale de doctorants en biologie dont le but principal était d'organiser des congrès, dans plusieurs villes de France, permettant aux acteurs économiques et aux doctorants du domaine des biotechnologies de se rencontrer et de mieux se connaître. J'ai été partie prenante de ce grand projet et organisatrice de ce type de congrès à Poitiers en 2002 en collaboration avec une association de doctorants de Poitiers. J'ai eu l'occasion de participer au recrutement d'un coordinateur dans le cadre de ce projet. Toute cette expérience a développé mon réseau de relation et mes capacités organisationnelles. Durant cette période j'ai donc appris ce qu'était la gestion d'un projet à l'échelle nationale.

Durant l'organisation de ce congrès ainsi que tout au long de mon doctorat, le travail en équipe fut d'une importance capitale et mon entourage professionnel eut un rôle important. Cependant étant seule à travailler sur mon sujet, j'ai aussi développé une certaine autonomie.

## IV. Evaluation des retombées de la thèse

Durant la conduite de ce projet, j'ai développé diverses compétences techniques et scientifiques qui me permettront de poursuivre dans le monde de la recherche. Mon travail aura permis de faire un état des lieux des connaissances sur mon sujet et permettra à d'autres chercheurs de trouver de nouvelles pistes. D'autre part, j'ai vu ma personnalité évoluer considérablement pendant ces quatre années. En effet, la thèse ne permet pas que l'acquisition de compétences strictement professionnelles mais permet aussi le développement personnel.

Je considère que les doctorants d'aujourd'hui plus que ceux d'hier doivent attacher une importance particulière à préciser tout au long de leur thèse leur projet professionnel et à développer leur ouverture d'esprit. C'est ce que je me suis attaché à faire tout au long de ces années. Pour moi, la thèse est une expérience professionnelle et c'est une formation qui offre un éventail assez large de possibilités. Personnellement, j'ai choisi dans un premier temps de continuer dans le monde de la recherche mais à l'étranger par la réalisation d'un post-doctorat. Ayant réalisé toutes mes études à Limoges, je pense qu'il est important que j'acquière une autre expérience dans un environnement différent afin de parfaire mes compétences et d'en développer de nouvelles. Cette expérience apportera également une plus-value à mon projet professionnel. Par la suite, je souhaiterais revenir en France pour entrer dans le monde de la recherche publique ou privée mais je n'exclue pas pour le moment de travailler à l'étranger. Dans tous les cas, mon objectif premier est de faire un travail qui me passionne et pour lequel on me donne les moyens humains, techniques et financiers nécessaires.



# *Références bibliographiques*



- Adachi, Y., A. Ishida-Takahashi, C. Takahashi, E. Takano, T. Murachi *et al.* (1991). *Phosphorylation and subcellular distribution of calpastatin in human hematopoietic system cells.* J Biol Chem. **266**: 3968-3972.
- Adachi, Y., N. Kobayashi, T. Murachi and M. Hatanaka. (1986). *Ca<sup>2+</sup>-dependent cysteine proteinase, calpains I and II are not phosphorylated in vivo.* Biochem Biophys Res Commun. **136**: 1090-1096.
- Andresen, K., T. D. Tom and M. Strand. (1991). *Characterization of cDNA clones encoding a novel calcium-activated neutral proteinase from Schistosoma mansoni.* J Biol Chem. **266**: 15085-15090.
- Aoki, K., S. Imajoh, S. Ohno, Y. Emori, M. Koike *et al.* (1986). *Complete amino acid sequence of the large subunit of the low-Ca<sup>2+</sup>-requiring form of human Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (muCANP) deduced from its cDNA sequence.* FEBS Lett. **205**: 313-317.
- Arranz, V., C. Dreuillet, P. Crisanti, J. Tillit, M. Kress *et al.* (2001). *The zinc finger transcription factor, MOK2, negatively modulates expression of the interphotoreceptor retinoid-binding protein gene, IRBP.* J Biol Chem. **276**: 11963-11969.
- Arthur, J. S., J. S. Elce, C. Hegadorn, K. Williams and P. A. Greer. (2000). *Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division.* Mol Cell Biol. **20**: 4474-4481.
- Arthur, J. S., S. Gauthier and J. S. Elce. (1995). *Active site residues in m-calpain: identification by site-directed mutagenesis.* FEBS Lett. **368**: 397-400.
- Arthur, J. S., P. A. Greer and J. S. Elce. (1998). *Structure of the mouse calpain small subunit gene.* Biochim Biophys Acta. **1388**: 247-252.
- Asada, K., Y. Ishino, M. Shimada, T. Shimojo, M. Endo *et al.* (1989). *cDNA cloning of human calpastatin: sequence homology among human, pig, and rabbit calpastatins.* J Enzyme Inhib. **3**: 49-56.
- Averna, M., R. De Tullio, F. Salamino, E. Melloni and S. Pontremoli. (1999). *Phosphorylation of rat brain calpastatins by protein kinase C.* FEBS Lett. **450**: 13-16.
- Azam, M., S. S. Andrabi, K. E. Sahr, L. Kamath, A. Kuliopulos *et al.* (2001). *Disruption of the mouse mu-calpain gene reveals an essential role in platelet function.* Mol Cell Biol. **21**: 2213-2220.
- Baghdiguian, S., M. Martin, I. Richard, F. Pons, C. Astier *et al.* (1999). *Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A.* Nat Med. **5**: 503-511.
- Baghdiguian, S., I. Richard, M. Martin, P. Coopman, J. S. Beckmann *et al.* (2001). *Pathophysiology of limb girdle muscular dystrophy type 2A: hypothesis and new insights into the IkappaBalpha/NF-kappaB survival pathway in skeletal muscle.* J Mol Med. **79**: 254-261.

- Baier, L. J., P. A. Permana, X. Yang, R. E. Pratley, R. L. Hanson *et al.* (2000). *A calpain-10 gene polymorphism is associated with reduced muscle mRNA levels and insulin resistance.* J Clin Invest. **106**: R69-73.
- Balcerzak, D., P. Cottin, S. Poussard, A. Cucuron, J. J. Brustis *et al.* (1998). *Calpastatin-modulation of m-calpain activity is required for myoblast fusion.* Eur J Cell Biol. **75**: 247-253.
- Balcerzak, D., S. Poussard, J. J. Brustis, N. Elamrani, M. Soriano *et al.* (1995). *An antisense oligodeoxyribonucleotide to m-calpain mRNA inhibits myoblast fusion.* J Cell Sci. **108**: 2077-2082.
- Barendse, W., 2002 DNA markers for meat tenderness., pp., Australia.
- Barnoy, S., T. Glasner and N. S. Kosower. (1996). *The role of calpastatin (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion.* Biochem Biophys Res Commun. **220**: 933-938.
- Barnoy, S., and N. S. Kosower. (2003). *Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems.* FEBS Lett. **546**: 213-217.
- Barnoy, S., L. Supino-Rosin and N. S. Kosower. (2000). *Regulation of calpain and calpastatin in differentiating myoblasts: mRNA levels, protein synthesis and stability.* Biochem J. **351 Pt 2**: 413-420.
- Behr, R., and G. F. Weinbauer. (2001). *cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates?* Int J Androl. **24**: 126-135.
- Betts, R., S. Weinsheimer, G. E. Blouse and J. Anagli. (2003). *Structural determinants of the calpain inhibitory activity of calpastatin peptide B27-WT.* J Biol Chem. **278**: 7800-7809.
- Bialkowska, K., S. Kulkarni, X. Du, D. E. Goll, T. C. Saido *et al.* (2000). *Evidence that beta3 integrin-induced Rac activation involves the calpain-dependent formation of integrin clusters that are distinct from the focal complexes and focal adhesions that form as Rac and RhoA become active.* J Cell Biol. **151**: 685-696.
- Blanchard, H., P. Grochulski, Y. Li, J. S. Arthur, P. L. Davies *et al.* (1997). *Structure of a calpain Ca(2+)-binding domain reveals a novel EF-hand and Ca(2+)-induced conformational changes.* Nat Struct Biol. **4**: 532-538.
- Boleman, S. J., S. L. Boleman, T. D. Bidner, K. W. Mcmillin and C. J. Monlezun. (1995). *Effects of post-mortem time calcium chloride injection on beef tenderness and drip, cooking, and total loss.* Meat Science. **39**: 35-41.
- Bomgardner, D., B. T. Hinton and T. T. Turner. (2003). *5' hox genes and meis 1, a hox-DNA binding cofactor, are expressed in the adult mouse epididymis.* Biol Reprod. **68**: 644-650.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapide and sensitive method for the quantification of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.* Anal Biochem. **72**: 248-254.
- Branca, D. (2004). *Calpain-related diseases.* Biochem Biophys Res Commun. **322**: 1098-1104.
- Brown, N., and C. Crawford. (1993). *Structural modifications associated with the change in Ca<sup>2+</sup> sensitivity on activation of m-calpain.* FEBS Lett. **322**: 65-68.

- Carafoli, E., and M. Molinari. (1998). *Calpain: a protease in search of a function?* Biochem Biophys Res Commun. **247**: 193-203.
- Carillo, S., M. Pariat, A. Steff, I. Jariel-Encontre, F. Poulat *et al.* (1996). *PEST motifs are not required for rapid calpain-mediated proteolysis of c-fos protein.* Biochem J. **313 (Pt 1)**: 245-251.
- Carlsson, E., J. Fredriksson, L. Groop and M. Ridderstrale. (2004). *Variation in the calpain-10 gene is associated with elevated triglyceride levels and reduced adipose tissue messenger ribonucleic acid expression in obese Swedish subjects.* J Clin Endocrinol Metab. **89**: 3601-3605.
- Carragher, N. O., M. A. Westhoff, D. Riley, D. A. Potter, P. Dutt *et al.* (2002). *v-Src-induced modulation of the calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation.* Mol Cell Biol. **22**: 257-269.
- Casas, E., S. D. Shackelford, J. W. Keele, R. T. Stone, S. M. Kappes *et al.* (2000). *Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin.* J Anim Sci. **78**: 560-569.
- Chen, M., and A. Stracher. (1989). *In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain.* J Biol Chem. **264**: 14282-14289.
- Chen, Y., R. Kittles, J. Zhou, G. Chen, A. Adeyemo *et al.* (2005). *Calpain-10 gene polymorphisms and type 2 diabetes in West Africans: the Africa America Diabetes Mellitus (AADM) Study.* Ann Epidemiol. **15**: 153-159.
- Chi, X. J., T. Hiwasa, M. Maki, S. Sugaya, J. Nomura *et al.* (1999). *Suppression of okadaic acid-induced apoptosis by overexpression of calpastatin in human UV(r)-1 cells.* FEBS Lett. **459**: 391-394.
- Choi, Y. H., S. J. Lee, P. Nguyen, J. S. Jang, J. Lee *et al.* (1997). *Regulation of cyclin D1 by calpain protease.* J Biol Chem. **272**: 28479-28484.
- Christensen, M., M. A. Young, M. A. Lawson, L. M. Larsen and P. P. Purslow. (2003). *Effect of added  $\mu$ -calpain and post-mortem storage on the mechanical properties of bovine single muscle fibres extended to fracture.* Meat Science. **66**: 105-112.
- Chua, B. T., K. Guo and P. Li. (2000). *Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases.* J Biol Chem. **275**: 5131-5135.
- Cong, J., D. E. Goll, A. M. Peterson and H. P. Kapprell. (1989). *The role of autolysis in activity of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinases ( $\mu$ -calpain and m-calpain).* J Biol Chem. **264**: 10096-10103.
- Cong, M., D. E. Goll and P. B. Antin. (1998a). *cAMP responsiveness of the bovine calpastatin gene promoter.* Biochim Biophys Acta. **1443**: 186-192.
- Cong, M., V. F. Thompson, D. E. Goll and P. B. Antin. (1998b). *The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity.* J Biol Chem. **273**: 660-666.

- Coolican, S. A., and D. R. Hathaway. (1984). *Effect of L-alpha-phosphatidylinositol on a vascular smooth muscle Ca<sup>2+</sup>-dependent protease. Reduction of the Ca<sup>2+</sup> requirement for autolysis.* J Biol Chem. **259**: 11627-11630.
- Culioli, J. (1999). *La qualité de la viande bovine : aspects biologiques et technologiques de la gestion de la tendreté.* Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France. **72**: 25-46
- Crawford, C., N. R. Brown and A. C. Willis. (1993). *Studies of the active site of m-calpain and the interaction with calpastatin.* Biochem J. **296**: 135-142.
- Croall, D. E., and K. S. Mcgrody. (1994). *Domain structure of calpain: mapping the binding site for calpastatin.* Biochemistry. **33**: 13223-13230.
- Dadoune, J. P., J. P. Siffroi and M. F. Alfonsi. (2004). *Transcription in haploid male germ cells.* Int Rev Cytol. **237**: 1-56.
- Dayton, W. R., D. E. Goll, M. G. Zeece, R. M. Robson and W. J. Reville. (1976). *A Ca<sup>2+</sup>-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle.* Biochemistry. **15**: 2150-2158.
- De Tullio, R., B. Sparatore, F. Salamino, E. Melloni and S. Pontremoli. (1998). *Rat brain contains multiple mRNAs for calpastatin.* FEBS Lett. **422**: 113-117.
- Dedieu, S., G. Mazeres, N. Dourdin, P. Cottin and J. J. Brustis. (2003a). *Transactivation of capn2 by myogenic regulatory factors during myogenesis.* J Mol Biol. **326**: 453-465.
- Dedieu, S., G. Mazeres, S. Poussard, J. J. Brustis and P. Cottin. (2003b). *Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS.* Biol Cell. **95**: 615-623.
- Del Bosque-Plata, L., C. A. Aguilar-Salinas, M. T. Tusie-Luna, S. Ramirez-Jimenez, M. Rodriguez-Torres *et al.* (2004). *Association of the calpain-10 gene with type 2 diabetes mellitus in a Mexican population.* Mol Genet Metab. **81**: 122-126.
- Deluca, C. I., P. L. Davies, J. A. Samis and J. S. Elce. (1993). *Molecular cloning and bacterial expression of cDNA for rat calpain II 80 kDa subunit.* Biochim Biophys Acta. **1216**: 81-93.
- Di Lisa, F., R. De Tullio, F. Salamino, R. Barbato, E. Melloni *et al.* (1995). *Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation.* Biochem J. **308 (Pt 1)**: 57-61.
- Doumit, M. E., and M. Koohmaraie. (1999). *Immunoblot analysis of calpastatin degradation: evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle.* J Anim Sci. **77**: 1467-1473.
- Drogemuller, C., and T. Leeb. (2002). *Molecular characterization of the porcine gene CAPNS1 encoding the small subunit 1 of calpain on SSC6q1.1-->q1.2.* Cytogenet Genome Res. **98**: 206-209.
- Dufour, E. and J-P. Frencia. (2001). *Une empreinte digitale de la viande.* Viande Prod. Carnés. **22**: 9-14.

- Dulong, S., S. Goudenege, K. Vuillier-Devillers, S. Manenti, S. Poussard *et al.* (2004). *Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is involved in myoblast fusion through its regulation by protein kinase Calpha and calpain proteolytic cleavage.* *Biochem J.* **382**: 1015-1023.
- Dutt, P., J. S. Arthur, P. Grochulski, M. Cygler and J. S. Elce. (2000). *Roles of individual EF-hands in the activation of m-calpain by calcium.* *Biochem J.* **348 Pt 1**: 37-43.
- Dutt, P., C. N. Spriggs, P. L. Davies, Z. Jia and J. S. Elce. (2002). *Origins of the difference in Ca<sup>2+</sup> requirement for activation of mu- and m-calpain.* *Biochem J.* **367**: 263-269.
- Edmunds, T., P. A. Nagainis, S. K. Sathe, V. F. Thompson and D. E. Goll. (1991). *Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle.* *Biochim Biophys Acta.* **1077**: 197-208.
- Elce, J. S., P. L. Davies, C. Hegadorn, D. H. Maurice and J. S. Arthur. (1997a). *The effects of truncations of the small subunit on m-calpain activity and heterodimer formation.* *Biochem J.* **326 (Pt 1)**: 31-38.
- Elce, J. S., C. Hegadorn and J. S. Arthur. (1997b). *Autolysis, Ca<sup>2+</sup> requirement, and heterodimer stability in m-calpain.* *J Biol Chem.* **272**: 11268-11275.
- Emori, Y., H. Kawasaki, S. Imajoh, K. Imahori and K. Suzuki. (1987). *Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**: 3590-3594.
- Emori, Y., H. Kawasaki, S. Imajoh, S. Kawashima and K. Suzuki. (1986a). *Isolation and sequence analysis of cDNA clones for the small subunit of rabbit calcium-dependent protease.* *J Biol Chem.* **261**: 9472-9476.
- Emori, Y., H. Kawasaki, S. Imajoh, Y. Minami and K. Suzuki. (1988). *All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in Escherichia coli.* *J Biol Chem.* **263**: 2364-2370.
- Emori, Y., H. Kawasaki, H. Sugihara, S. Imajoh, S. Kawashima *et al.* (1986b). *Isolation and sequence analyses of cDNA clones for the large subunits of two isozymes of rabbit calcium-dependent protease.* *J Biol Chem.* **261**: 9465-9471.
- Emori, Y., S. Ohno, M. Tobita and K. Suzuki. (1986c). *Gene structure of calcium-dependent protease retains the ancestral organization of the calcium-binding protein gene.* *FEBS Lett.* **194**: 249-252.
- Figueiredo-Pereira, M. E., S. Efthimiopoulos, N. Tezapsidis, A. Buku, J. Ghiso *et al.* (1999). *Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively.* *J Neurochem.* **72**: 1417-1422.
- Geay, Y., D. Bauchart, J-F. Hocquette and J. Culioli. (2001). *Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants: consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat.* *Reprod Nutr Dev.* **41**: 1-26. Erratum. **41**: 377.

- Geesink, G. H., and M. Koohmaraie. (1999). *Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by mu-calpain under postmortem conditions*. J Anim Sci. **77**: 2685-2692.
- Geesink, G. H., D. Nonneman and M. Koohmaraie. (1998). *An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing*. Arch Biochem Biophys. **356**: 19-24.
- Gil-Parrado, S., O. Popp, T. A. Knoch, S. Zahler, F. Bestvater *et al.* (2003). *Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain*. J Biol Chem. **278**: 16336-16346.
- Goll, D. E., V. F. Thompson, H. Li, W. Wei and J. Cong. (2003). *The calpain system*. Physiol Rev. **83**: 731-801.
- Goll, D. E., V. F. Thompson, R. G. Taylor and T. Zalewska. (1992). *Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin?* Bioessays. **14**: 549-556.
- Gonen, H., D. Shkedy, S. Barnoy, N. S. Kosower and A. Ciechanover. (1997). *On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53*. FEBS Lett. **406**: 17-22.
- Griffin, M. E., M. J. Marcucci, G. W. Cline, K. Bell, N. Barucci *et al.* (1999). *Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade*. Diabetes. **48**: 1270-1274.
- Grynspan, F., W. R. Griffin, A. Cataldo, S. Katayama and R. A. Nixon. (1997). *Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease*. Brain Res. **763**: 145-158.
- Guttmann, R. P., J. S. Elce, P. D. Bell, J. C. Isbell and G. V. Johnson. (1997). *Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis*. J Biol Chem. **272**: 2005-2012.
- Hanis, C. L., E. Boerwinkle, R. Chakraborty, D. L. Ellsworth, P. Concannon *et al.* (1996). *A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2*. Nat Genet. **13**: 161-166.
- Hata, A., S. Ohno, Y. Akita and K. Suzuki. (1989). *Tandemly reiterated negative enhancer-like elements regulate transcription of a human gene for the large subunit of calcium-dependent protease*. J Biol Chem. **264**: 6404-6411.
- Hata, A., S. Ohno and K. Suzuki. (1992). *Transcriptional activation of the gene for the large subunit of human m-calpain by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*. FEBS Lett. **304**: 241-244.
- Hayashi, M., Y. Saito and S. Kawashima. (1992). *Calpain activation is essential for membrane fusion of erythrocytes in the presence of exogenous Ca<sup>2+</sup>*. Biochem Biophys Res Commun. **182**: 939-946.
- Herasse, M., Y. Ono, F. Fougerousse, E. Kimura, D. Stockholm *et al.* (1999). *Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events*. Mol Cell Biol. **19**: 4047-4055.

- Hirai, S., H. Kawasaki, M. Yaniv and K. Suzuki. (1991). *Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain*. FEBS Lett. **287**: 57-61.
- Hopkins, D. L., and J. M. Thompson. (2001a). *Inhibition of protease activity. Degradation of myofibrillar proteins, myofibril examination and determination of free calcium level*. Meat Science. **59**: 199-209.
- Hopkins, D. L., and J. M. Thompson. (2001b). *Inhibition of protease activity. The effect of tenderness and indicators of proteolysis in ovine muscle*. Meat Science. **59**: 175-185.
- Horikawa, Y., N. Oda, N. J. Cox, X. Li, M. Orho-Melander et al. (2000). *Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet. **26**: 163-175.
- Hosfield, C. M., J. S. Elce, P. L. Davies and Z. Jia. (1999). *Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation*. Embo J. **18**: 6880-6889.
- Howard, T., R. Balogh, P. Overbeek and K. E. Bernstein. (1993). *Sperm-specific expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) is mediated by a 91-base-pair promoter containing a CRE-like element*. Mol Cell Biol. **13**: 18-27.
- Huang, Y., and K. K. Wang. (2001). *The calpain family and human disease*. Trends Mol Med. **7**: 355-362.
- Huff-Lonergan, E., T. Mitsuhashi, D. D. Beekman, F. C. Parrish, Jr., D. G. Olson et al. (1996). *Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle*. J Anim Sci. **74**: 993-1008.
- Ike, A., S. Yamada, H. Tanaka, Y. Nishimune and M. Nozaki. (2002). *Structure and promoter activity of the gene encoding ornithine decarboxylase antizyme expressed exclusively in haploid germ cells in testis (OAZ1/Oaz3)*. Gene. **298**: 183-193.
- Ilian, M. A., J. D. Morton, M. P. Kent, C. E. Le Couteur, J. Hickford et al. (2001). *Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains*. J Anim Sci. **79**: 122-132.
- Imajoh, S., H. Kawasaki, Y. Emori and K. Suzuki. (1987). *Calcium-activated neutral protease inhibitor from rabbit erythrocytes lacks the N-terminal region of the liver inhibitor but retains three inhibitory units*. Biochem Biophys Res Commun. **146**: 630-637.
- Imajoh, S., and K. Suzuki. (1985). *Reversible interaction between Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (CANP) and its endogenous inhibitor*. FEBS Lett. **187**: 47-50.
- Institut de l'Élevage. (1992). *Le point sur la tendreté de la viande de boeuf : L'appréciation de la tendreté*. Collection Interbev.
- Ishida, S., Y. Emori and K. Suzuki. (1991). *Rat calpastatin has diverged primary sequence from other mammalian calpastatins but retains functionally important sequences*. Biochim Biophys Acta. **1088**: 436-438.
- Ishima, R., A. Tamura, K. Akasaka, K. Hamaguchi, K. Makino et al. (1991). *Structure of the active 27-residue fragment of human calpastatin*. FEBS Lett. **294**: 64-66.

- Itani, S. I., Q. Zhou, W. J. Porics, K. G. Macdonald and G. L. Dohm. (2000). *Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity*. *Diabetes*. **49**: 1353-1358.
- Iwasaki, N., Y. Horikawa, T. Tsuchiya, Y. Kitamura, T. Nakamura *et al.* (2005). *Genetic variants in the calpain-10 gene and the development of type 2 diabetes in the Japanese population*. *J Hum Genet*. **50**: 92-98.
- Jeon, J. T., V. Amarger, C. Rogel-Gaillard, A. Robic, E. Bongcam-Rudloff *et al.* (2001). *Comparative analysis of a BAC contig of the porcine RN region and the human transcript map: implications for the cloning of trait loci*. *Genomics*. **72**: 297-303.
- Jia, Z., V. Petrounevitch, A. Wong, T. Moldoveanu, P. L. Davies *et al.* (2001). *Mutations in calpain 3 associated with limb girdle muscular dystrophy: analysis by molecular modeling and by mutation in m-calpain*. *Biophys J*. **80**: 2590-2596.
- Johnson, J. D., Z. Han, K. Otani, H. Ye, Y. Zhang *et al.* (2004). *RyR2 and calpain-10 delineate a novel apoptosis pathway in pancreatic islets*. *J Biol Chem*. **279**: 24794-24802.
- Kapprell, H. P., and D. E. Goll. (1989). *Effect of Ca<sup>2+</sup> on binding of the calpains to calpastatin*. *J Biol Chem*. **264**: 17888-17896.
- Kawasaki, H., Y. Emori, S. Imajoh-Ohmi, Y. Minami and K. Suzuki. (1989). *Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease*. *J Biochem (Tokyo)*. **106**: 274-281.
- Keele, J. W., S. D. Shackelford, S. M. Kappes, M. Koohmaraie and R. T. Stone. (1999). *A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers*. *J Anim Sci*. **77**: 1364-1371.
- Kent, M. P., M. J. Spencer and M. Koohmaraie. (2004). *Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin*. *J Anim Sci*. **82**: 794-801.
- Kidd, V. J., J. M. Lahti and T. Teitz. (2000). *Proteolytic regulation of apoptosis*. *Semin Cell Dev Biol*. **11**: 191-201.
- Killefer, J., and M. Koohmaraie. (1994). *Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression*. *J Anim Sci*. **72**: 606-614.
- Kinbara, K., H. Sorimachi, S. Ishiura and K. Suzuki. (1998). *Skeletal muscle-specific calpain, p94: structure and physiological function*. *Biochem Pharmacol*. **56**: 415-420.
- Kishimoto, A., K. Mikawa, K. Hashimoto, I. Yasuda, S. Tanaka *et al.* (1989). *Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain)*. *J Biol Chem*. **264**: 4088-4092.
- Knepper-Nicolai, B., J. Savill and S. B. Brown. (1998). *Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and the proteasome downstream of caspases*. *J Biol Chem*. **273**: 30530-30536.
- Konno, T., N. Tanaka, M. Kataoka, E. Takano and M. Maki. (1997). *A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I*. *Biochim Biophys Acta*. **1342**: 73-82.

- Koohmaraie, M. (1992a). *Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with mu-calpains*. J Anim Sci. **70**: 3697-3708.
- Koohmaraie, M. (1992b). *The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness*. Biochimie. **74**: 239-245.
- Koohmaraie, M. (1994). *Muscle proteinases and meat aging*. Meat Science. **36**: 93-104.
- Koohmaraie, M., A. L. Babiker, R. A. Schroeder, R. A. Merkel and T. R. Dutson. (1988). *Acceleration of post-mortem tenderization in ovine carcass through activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases*. Journal of food science. **53**: 1638-1641.
- Kubbutat, M. H., and K. H. Vousden. (1997). *Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability*. Mol Cell Biol. **17**: 460-468.
- Kulkarni, S., D. E. Goll and J. E. Fox. (2002). *Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading*. J Biol Chem. **277**: 24435-24441.
- Kulkarni, S., T. C. Saido, K. Suzuki and J. E. Fox. (1999). *Calpain mediates integrin-induced signaling at a point upstream of Rho family members*. J Biol Chem. **274**: 21265-21275.
- Kumamoto, T., W. C. Kleese, J. Y. Cong, D. E. Goll, P. R. Pierce et al. (1992). *Localization of the Ca(2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle*. Anat Rec. **232**: 60-77.
- Kusakawa, G., T. Saito, R. Onuki, K. Ishiguro, T. Kishimoto et al. (2000). *Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25*. J Biol Chem. **275**: 17166-17172.
- Kwak, K. B., S. S. Chung, O. M. Kim, M. S. Kang, D. B. Ha et al. (1993a). *Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells*. Biochim Biophys Acta. **1175**: 243-249.
- Kwak, K. B., J. Kambayashi, M. S. Kang, D. B. Ha and C. H. Chung. (1993b). *Cell-penetrating inhibitors of calpain block both membrane fusion and filamin cleavage in chick embryonic myoblasts*. FEBS Lett. **323**: 151-154.
- Lane, R. D., R. L. Mellgren and M. T. Mericle. (1985). *Subcellular localization of bovine heart calcium-dependent protease inhibitor*. J Mol Cell Cardiol. **17**: 863-872.
- Langford, K. G., S. Y. Shai, T. E. Howard, M. J. Kovac, P. A. Overbeek et al. (1991). *Transgenic mice demonstrate a testis-specific promoter for angiotensin-converting enzyme*. J Biol Chem. **266**: 15559-15562.
- Laval, S. H., and K. M. Bushby. (2004). *Limb-girdle muscular dystrophies--from genetics to molecular pathology*. Neuropathol Appl Neurobiol. **30**: 91-105.
- Lee, M. S., Y. T. Kwon, M. Li, J. Peng, R. M. Friedlander et al. (2000). *Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain*. Nature. **405**: 360-364.

- Lee, W. J., M. Hatanaka and M. Maki. (1992a). *Multiple forms of rat calpastatin cDNA in the coding region of functionally unknown amino-terminal domain*. *Biochim Biophys Acta*. **1129**: 251-253.
- Lee, W. J., H. Ma, E. Takano, H. Q. Yang, M. Hatanaka *et al.* (1992b). *Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping*. *J Biol Chem*. **267**: 8437-8442.
- Leissring, M. A., Y. Akbari, C. M. Fanger, M. D. Cahalan, M. P. Mattson *et al.* (2000). *Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice*. *J Cell Biol*. **149**: 793-798.
- Lepetit, J. and J-L. Damez. (2002). *Prévision de l'état de maturation de la viande bovine par des méthodes électriques*. *Echo des Puy*. **53**: 4.
- Li, S., and E. Goldberg. (2000). *A novel N-terminal domain directs membrane localization of mouse testis-specific calpastatin*. *Biol Reprod*. **63**: 1594-1600.
- Li, S., Z. G. Liang, G. Y. Wang, B. Yavetz, E. D. Kim *et al.* (2000). *Molecular cloning and characterization of functional domains of a human testis-specific isoform of calpastatin*. *Biol Reprod*. **63**: 172-178.
- Lid, S. E., D. Gruis, R. Jung, J. A. Lorentzen, E. Ananiev *et al.* (2002). *The defective kernel 1 (dek1) gene required for aleurone cell development in the endosperm of maize grains encodes a membrane protein of the calpain gene superfamily*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**: 5460-5465.
- Lin, G. D., D. Chattopadhyay, M. Maki, K. K. Wang, M. Carson *et al.* (1997). *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*. **4**: 539-547.
- Lindsay, R. S., M. Prochazka, L. J. Baier, W. C. Knowler, C. Bogardus *et al.* (2002). *Currently identified genes affecting insulin resistance are not associated with birth weight in the Pima population*. *Diabet Med*. **19**: 882-884.
- Litersky, J. M., and G. V. Johnson. (1992). *Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain*. *J Biol Chem*. **267**: 1563-1568.
- Lu, T., Y. Xu, M. T. Mericle and R. L. Mellgren. (2002). *Participation of the conventional calpains in apoptosis*. *Biochim Biophys Acta*. **1590**: 16-26.
- Ma, H., C. Fukiage, M. Azuma and T. R. Shearer. (1998a). *Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **39**: 454-461.
- Ma, H., C. Fukiage, Y. H. Kim, M. K. Duncan, N. A. Reed *et al.* (2001). *Characterization and expression of calpain 10. A novel ubiquitous calpain with nuclear localization*. *J Biol Chem*. **276**: 28525-28531.
- Ma, H., M. Shih, I. Hata, C. Fukiage, M. Azuma *et al.* (1998b). *Protein for Lp82 calpain is expressed and enzymatically active in young rat lens*. *Exp Eye Res*. **67**: 221-229.

- Ma, H., H. Q. Yang, E. Takano, M. Hatanaka and M. Maki. (1994). *Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase.* J Biol Chem. **269**: 24430-24436.
- Maki, M., H. Bagci, K. Hamaguchi, M. Ueda, T. Murachi *et al.* (1989). *Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene.* J Biol Chem. **264**: 18866-18869.
- Maki, M., E. Takano, T. Osawa, T. Ooi, T. Murachi *et al.* (1988). *Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in Escherichia coli.* J Biol Chem. **263**: 10254-10261.
- Maltin, C., D. Balcerzak, R. Tilley and M. Delday. (2003). *Determinants of meat quality: tenderness.* Proceedings of the Nutrition Society. **62**: 337-347.
- Margalit, Y., S. Yarus, E. Shapira, Y. Gruenbaum and A. Fainsod. (1993). *Isolation and characterization of target sequences of the chicken CdxA homeobox gene.* Nucleic Acids Res. **21**: 4915-4922.
- Martin, S. J., G. A. O'Brien, W. K. Nishioka, A. J. Mcgahon, A. Mahboubi *et al.* (1995). *Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis.* J Biol Chem. **270**: 6425-6428.
- Mccelland, P., J. A. Lash and D. R. Hathaway. (1989). *Identification of major autolytic cleavage sites in the regulatory subunit of vascular calpain II. A comparison of partial amino-terminal sequences to deduced sequence from complementary DNA.* J Biol Chem. **264**: 17428-17431.
- Mellgren, R. L. (1997). *Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase.* Biochem Biophys Res Commun. **236**: 555-558.
- Mellgren, R. L., R. D. Lane and S. S. Kakar. (1987). *A sarcolemma-associated inhibitor is capable of modulating calcium-dependent proteinase activity.* Biochim Biophys Acta. **930**: 370-377.
- Mellgren, R. L., R. D. Lane and M. T. Mericle. (1989). *The binding of large calpastatin to biologic membranes is mediated in part by interaction of an amino terminal region with acidic phospholipids.* Biochim Biophys Acta. **999**: 71-77.
- Mellgren, R. L., Q. Lu, W. Zhang, M. Lakkis, E. Shaw *et al.* (1996). *Isolation of a Chinese hamster ovary cell clone possessing decreased mu-calpain content and a reduced proliferative growth rate.* J Biol Chem. **271**: 15568-15574.
- Melloni, E., M. Michetti, F. Salamino and S. Pontremoli. (1998). *Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for mu-isoforms.* J Biol Chem. **273**: 12827-12831.
- Melloni, E., R. Minafra, F. Salamino and S. Pontremoli. (2000). *Properties and intracellular localization of calpain activator protein.* Biochem Biophys Res Commun. **272**: 472-476.
- Minami, Y., Y. Emori, S. Imajoh-Ohmi, H. Kawasaki and K. Suzuki. (1988). *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). **104**: 927-933.

- Minami, Y., Y. Emori, H. Kawasaki and K. Suzuki. (1987). *E-F hand structure-domain of calcium-activated neutral protease (CANP) can bind Ca<sup>2+</sup> ions*. J Biochem (Tokyo). **101**: 889-895.
- Miyake, S., Y. Emori and K. Suzuki. (1986). *Gene organization of the small subunit of human calcium-activated neutral protease*. Nucleic Acids Res. **14**: 8805-8817.
- Moldoveanu, T., C. M. Hosfield, D. Lim, J. S. Elce, Z. Jia *et al.* (2002). *A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain*. Cell. **108**: 649-660.
- Molinari, M., J. Anagli and E. Carafoli. (1995). *PEST sequences do not influence substrate susceptibility to calpain proteolysis*. J Biol Chem. **270**: 2032-2035.
- Moyen, C., S. Goudenege, S. Poussard, A. H. Sassi, J. J. Brustis *et al.* (2004). *Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation*. Int J Biochem Cell Biol. **36**: 728-743.
- Nakagawa, T., and J. Yuan. (2000). *Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis*. J Cell Biol. **150**: 887-894.
- Nakamura, Y., C. Fukiage, H. Ma, M. Shih, M. Azuma *et al.* (1999). *Decreased sensitivity of lens-specific calpain Lp82 to calpastatin inhibitor*. Exp Eye Res. **69**: 155-162.
- Nakamura, Y., C. Fukiage, M. Shih, H. Ma, L. L. David *et al.* (2000). *Contribution of calpain Lp82-induced proteolysis to experimental cataractogenesis in mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci. **41**: 1460-1466.
- Nishimura, T., and D. E. Goll. (1991). *Binding of calpain fragments to calpastatin*. J Biol Chem. **266**: 11842-11850.
- Noguchi, M., A. Sarin, M. J. Aman, H. Nakajima, E. W. Shores *et al.* (1997). *Functional cleavage of the common cytokine receptor gamma chain (gammac) by calpain*. Proc Natl Acad Sci U S A. **94**: 11534-11539.
- Nonneman, D., S. M. Kappes and M. Koohmaraie. (1999). *Rapid communication: a polymorphic microsatellite in the promoter region of the bovine calpastatin gene*. J Anim Sci. **77**: 3114-3115.
- Ohno, S., Y. Emori, S. Imajoh, H. Kawasaki, M. Kisaragi *et al.* (1984). *Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein?* Nature. **312**: 566-570.
- Ohno, S., Y. Emori and K. Suzuki. (1986). *Nucleotide sequence of a cDNA coding for the small subunit of human calcium-dependent protease*. Nucleic Acids Res. **14**: 5559.
- Ohno, S., S. Minoshima, J. Kudoh, R. Fukuyama, Y. Shimizu *et al.* (1990). *Four genes for the calpain family locate on four distinct human chromosomes*. Cytogenet Cell Genet. **53**: 225-229.
- Orho-Melander, M., M. Klannemark, M. K. Svensson, M. Ridderstrale, C. M. Lindgren *et al.* (2002). *Variants in the calpain-10 gene predispose to insulin resistance and elevated free fatty acid levels*. Diabetes. **51**: 2658-2664.
- Otsuka, Y., and D. E. Goll. (1987). *Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase*. J Biol Chem. **262**: 5839-5851.

- Oulai, A. (1990). *Meat tenderisation: possible causes and mechanisms*. J Muscle Food. **1**: 129-165.
- Oulai, A. and A. Talmant. (1990). *Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles*. Meat Science. **28**: 331-348.
- Page, B. T., E. Casas, M. P. Heaton, N. G. Cullen, D. L. Hyndman *et al.* (2002). *Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle*. J Anim Sci. **80**: 3077-3085.
- Pariat, M., S. Carillo, M. Molinari, C. Salvat, L. Debussche *et al.* (1997). *Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53*. Mol Cell Biol. **17**: 2806-2815.
- Pariat, M., C. Salvat, M. Bebien, F. Brockly, E. Altieri *et al.* (2000). *The sensitivity of c-Jun and c-Fos proteins to calpains depends on conformational determinants of the monomers and not on formation of dimers*. Biochem J. **345 Pt 1**: 129-138.
- Parr, T., R. G. Bardsley, R. S. Gilmour and P. J. Buttery. (1992). *Changes in calpain and calpastatin mRNA induced by beta-adrenergic stimulation of bovine skeletal muscle*. Eur J Biochem. **208**: 333-339.
- Parr, T., K. K. Jewell, P. L. Sensky, J. M. Brameld, R. G. Bardsley *et al.* (2004). *Expression of calpastatin isoforms in muscle and functionality of multiple calpastatin promoters*. Arch Biochem Biophys. **427**: 8-15.
- Parr, T., P. L. Sensky, M. K. Arnold, R. G. Bardsley and P. J. Buttery. (2000). *Effects of epinephrine infusion on expression of calpastatin in porcine cardiac and skeletal muscle*. Arch Biochem Biophys. **374**: 299-305.
- Parr, T., P. L. Sensky, R. G. Bardsley and P. J. Buttery. (2001). *Calpastatin expression in porcine cardiac and skeletal muscle and partial gene structure*. Arch Biochem Biophys. **395**: 1-13.
- Parr, T., P. L. Sensky, G. P. Scothern, R. G. Bardsley, P. J. Buttery *et al.* (1999). *Relationship between skeletal muscle-specific calpain and tenderness of conditioned porcine longissimus muscle*. J Anim Sci. **77**: 661-668.
- Pfaff, M., X. Du and M. H. Ginsberg. (1999). *Calpain cleavage of integrin beta cytoplasmic domains*. FEBS Lett. **460**: 17-22.
- Poirier, C., S. Poussard, D. M. Faust, T. Imaizumi-Scherrer, M. C. Weiss *et al.* (1998). *Mapping, cloning, cDNA sequence, and expression of the gene encoding the mouse micromolar calpain large subunit*. Mamm Genome. **9**: 388-389.
- Polidori, P., M. T. Marinucci, C. Fantuz, C. Renieri and F. Polidori. (2000). *Tenderization of wether lambs meat through pre-rigor infusion of calcium ions*. Meat Science. **55**: 197-200.
- Pontremoli, S., E. Melloni, M. Michetti, F. Salamino, B. Sparatore *et al.* (1988). *An endogenous activator of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase of human neutrophils that increases its affinity for Ca<sup>2+</sup>*. Proc Natl Acad Sci U S A. **85**: 1740-1743.
- Pontremoli, S., E. Melloni, P. L. Viotti, M. Michetti, F. Di Lisa *et al.* (1990a). *Isovalerylcarnitine is a specific activator of the high calcium requiring calpain forms*. Biochem Biophys Res Commun. **167**: 373-380.

- Pontremoli, S., P. L. Viotti, M. Michetti, B. Sparatore, F. Salamino *et al.* (1990b). *Identification of an endogenous activator of calpain in rat skeletal muscle*. *Biochem Biophys Res Commun.* **171**: 569-574.
- Poussard, S., M. Duvert, D. Balcerzak, S. Ramassamy, J. J. Brustis *et al.* (1996). *Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity*. *Cell Growth Differ.* **7**: 1461-1469.
- Rajkovic, M., R. Middendorff, M. G. Wetzel, D. Frkovic, S. Damerow *et al.* (2004). *Germ cell nuclear factor relieves cAMP-response element modulator tau-mediated activation of the testis-specific promoter of human mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase*. *J Biol Chem.* **279**: 52493-52499.
- Rasmussen, S. K., S. A. Urhammer, L. Berglund, J. N. Jensen, L. Hansen *et al.* (2002). *Variants within the calpain-10 gene on chromosome 2q37 (NIDDM1) and relationships to type 2 diabetes, insulin resistance, and impaired acute insulin secretion among Scandinavian Caucasians*. *Diabetes.* **51**: 3561-3567.
- Reddy, A. S., F. Safadi, J. R. Beyette and D. L. Mykles. (1994). *Calcium-dependent proteinase activity in root cultures of Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun.* **199**: 1089-1095.
- Reverter, D., H. Sorimachi and W. Bode. (2001a). *The Structure of Calcium-Free Human m-Calpain. Implications for Calcium Activation and Function*. *Trends Cardiovasc Med.* **11**: 222-229.
- Reverter, D., S. Strobl, C. Fernandez-Catalan, H. Sorimachi, K. Suzuki *et al.* (2001b). *Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains*. *Biol Chem.* **382**: 753-766.
- Richard, I., O. Broux, V. Allamand, F. Fougerousse, N. Chiannikulchai *et al.* (1995). *Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. *Cell.* **81**: 27-40.
- Ruiz-Vela, A., F. Serrano, M. A. Gonzalez, J. L. Abad, A. Bernad *et al.* (2001). *Transplanted long-term cultured pre-BI cells expressing calpastatin are resistant to B cell receptor-induced apoptosis*. *J Exp Med.* **194**: 247-254.
- Safadi, F., D. L. Mykles and A. S. Reddy. (1997). *Partial purification and characterization of a Ca(2+)-dependent proteinase from Arabidopsis roots*. *Arch Biochem Biophys.* **348**: 143-151.
- Saido, T. C., M. Shibata, T. Takenawa, H. Murofushi and K. Suzuki. (1992). *Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides*. *J Biol Chem.* **267**: 24585-24590.
- Saido, T. C., M. Yokota, S. Nagao, I. Yamaura, E. Tani *et al.* (1993). *Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain*. *J Biol Chem.* **268**: 25239-25243.
- Saito, K., J. S. Elce, J. E. Hamos and R. A. Nixon. (1993). *Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 2628-2632.
- Sakai, K., H. Akanuma, K. Imahori and S. Kawashima. (1987). *A unique specificity of a calcium activated neutral protease indicated in histone hydrolysis*. *J Biochem (Tokyo).* **101**: 911-918.

- Salamino, F., R. De Tullio, M. Michetti, P. Mengotti, E. Melloni *et al.* (1994). *Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation*. *Biochem Biophys Res Commun.* **199**: 1326-1332.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74**: 5463-5467.
- Sasaki, T., T. Kikuchi, N. Yumoto, N. Yoshimura and T. Murachi. (1984). *Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates*. *J Biol Chem.* **259**: 12489-12494.
- Schad, E., A. Farkas, G. Jekely, P. Tompa and P. Friedrich. (2002). *A novel human small subunit of calpains*. *Biochem J.* **362**: 383-388.
- Schollmeyer, J. E. (1986a). *Possible role of calpain I and calpain II in differentiating muscle*. *Exp Cell Res.* **163**: 413-422.
- Schollmeyer, J. E. (1986b). *Role of Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-activated protease in myoblast fusion*. *Exp Cell Res.* **162**: 411-422.
- Selkoe, D. J. (2001). *Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein*. *J Alzheimers Dis.* **3**: 75-80.
- Sentadreu, M. A., G. Coulis and A. Ouali. (2002). *Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness*. *Trends in Food Science and Technology.* **13**: 400-421.
- Shapiro, M. B., and P. Senapathy. (1987). *RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 7155-7174.
- Shumway, S. D., M. Maki and S. Miyamoto. (1999). *The PEST domain of IkappaBalpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain*. *J Biol Chem.* **274**: 30874-30881.
- Smith, T. P., E. Casas, C. E. Rexroad, 3rd, S. M. Kappes and J. W. Keele. (2000). *Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness*. *J Anim Sci.* **78**: 2589-2594.
- Smith, T. P., F. A. Simmen, G. Zhao and J. L. Vallet. (2001). *Rapid communication: Nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calcium-activated neutral protease 1 cDNA*. *J Anim Sci.* **79**: 552-553.
- Sorimachi, H., S. Imajoh-Ohmi, Y. Emori, H. Kawasaki, S. Ohno *et al.* (1989). *Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle*. *J Biol Chem.* **264**: 20106-20111.
- Sorimachi, H., S. Ishiura and K. Suzuki. (1993). *A novel tissue-specific calpain species expressed predominantly in the stomach comprises two alternative splicing products with and without Ca(2+)-binding domain*. *J Biol Chem.* **268**: 19476-19482.
- Squier, M. K., A. J. Sehnert, K. S. Sellins, A. M. Malkinson, E. Takano *et al.* (1999). *Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis*. *J Cell Physiol.* **178**: 311-319.

- Sreenan, S. K., Y. P. Zhou, K. Otani, P. A. Hansen, K. P. Currie *et al.* (2001). *Calpains play a role in insulin secretion and action*. *Diabetes*. **50**: 2013-2020.
- Strobl, S., C. Fernandez-Catalan, M. Braun, R. Huber, H. Masumoto *et al.* (2000). *The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**: 588-592.
- Suzuki, K., Y. Emori, S. Ohno, S. Imahori, H. Kawasaki *et al.* (1986). *Structure and function of the small (30K) subunit of calcium-activated neutral protease (CANP)*. *Biomed Biochim Acta*. **45**: 1487-1491.
- Suzuki, K., S. Hata, Y. Kawabata and H. Sorimachi. (2004). *Structure, activation, and biology of calpain*. *Diabetes*. **53** **Suppl 1**: S12-18.
- Suzuki, K., S. Tsuji, S. Ishiura, Y. Kimura, S. Kubota *et al.* (1981a). *Autolysis of calcium-activated neutral protease of chicken skeletal muscle*. *J Biochem (Tokyo)*. **90**: 1787-1793.
- Suzuki, K., S. Tsuji, S. Kubota, Y. Kimura and K. Imahori. (1981b). *Limited autolysis of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca<sup>2+</sup> ions*. *J Biochem (Tokyo)*. **90**: 275-278.
- Takano, E., H. Ma, H. Q. Yang, M. Maki and M. Hatanaka. (1995). *Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains*. *FEBS Lett*. **362**: 93-97.
- Takano, E., M. Maki, H. Mori, M. Hatanaka, T. Marti *et al.* (1988). *Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis*. *Biochemistry*. **27**: 1964-1972.
- Takano, E., and T. Murachi. (1982). *Purification and some properties of human erythrocyte calpastatin*. *J Biochem (Tokyo)*. **92**: 2021-2028.
- Takano, J., T. Kawamura, M. Murase, K. Hitomi and M. Maki. (1999). *Structure of mouse calpastatin isoforms: implications of species-common and species-specific alternative splicing*. *Biochem Biophys Res Commun*. **260**: 339-345.
- Takano, J., M. Watanabe, K. Hitomi and M. Maki. (2000). *Four types of calpastatin isoforms with distinct amino-terminal sequences are specified by alternative first exons and differentially expressed in mouse tissues*. *J Biochem (Tokyo)*. **128**: 83-92.
- Taylor, R. G., J. A. Christiansen and D. E. Goll. (1991). *Immunolocalization of the calpains and calpastatin in human and bovine platelets*. *Biomed Biochim Acta*. **50**: 491-498.
- Taylor, R. G., G. H. Geesink, V. F. Thompson, M. Koohmaraie and D. E. Goll. (1995). *Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization?* *J Anim Sci*. **73**: 1351-1367.
- Temm-Grove, C. J., D. Wert, V. F. Thompson, R. E. Allen and D. E. Goll. (1999). *Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts*. *Exp Cell Res*. **247**: 293-303.

- Theologis, A., J. R. Ecker, C. J. Palm, N. A. Federspiel, S. Kaul *et al.* (2000). *Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant Arabidopsis thaliana*. Nature. **408**: 816-820.
- Todd, B., D. Moore, C. C. Deivanayagam, G. D. Lin, D. Chattopadhyay *et al.* (2003). *A structural model for the inhibition of a small molecule inhibitor*. J Mol Biol. **328**: 131-146.
- Tompa, P., P. Buzder-Lantos, A. Tantos, A. Farkas, A. Szilagyí *et al.* (2004). *On the sequential determinants of calpain cleavage*. J Biol Chem. **279**: 20775-20785.
- Tompa, P., Y. Emori, H. Sorimachi, K. Suzuki and P. Friedrich. (2001). *Domain III of calpain is a  $Ca^{2+}$ -regulated phospholipid-binding domain*. Biochem Biophys Res Commun. **280**: 1333-1339.
- Tsuji, T., S. Shimohama, J. Kimura and K. Shimizu. (1998). *m-Calpain (calcium-activated neutral proteinase) in Alzheimer's disease brains*. Neurosci Lett. **248**: 109-112.
- Uemori, T., T. Shimojo, K. Asada, T. Asano, F. Kimizuka *et al.* (1990). *Characterization of a functional domain of human calpastatin*. Biochem Biophys Res Commun. **166**: 1485-1493.
- Weiseth, E., and M. Koohmaraie, 2005 *Beef tenderness: significance of the calpain proteolytic system*. Wageningen Academic Publishers.
- Wang, K. K., R. Posmantur, R. Nadimpalli, R. Nath, P. Mohan *et al.* (1998). *Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis*. Arch Biochem Biophys. **356**: 187-196.
- Wei, S. G., L. F. Wang, S. Y. Miao, S. D. Zong and S. S. Koide. (1995). *Expression of the calpastatin gene segment during spermiogenesis in human testis: an in situ hybridization study*. Arch Androl. **34**: 9-12.
- Wendt, A., V. F. Thompson and D. E. Goll. (2004). *Interaction of calpastatin with calpain: a review*. Biol Chem. **385**: 465-472.
- Whipple, G., M. Koohmaraie, M. E. Dikeman and J. D. Crouse. (1990). *Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits*. J Anim Sci. **68**: 4193-4199.
- Wolf, B. B., J. C. Goldstein, H. R. Stennicke, H. Beere, G. P. Amarante-Mendes *et al.* (1999). *Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation*. Blood. **94**: 1683-1692.
- Xie, X., M. D. Dwyer, L. Swenson, M. H. Parker and M. C. Botfield. (2001). *Crystal structure of calcium-free human sorcin: a member of the penta-EF-hand protein family*. Protein Sci. **10**: 2419-2425.
- Xu, Y., and R. L. Mellgren. (2002). *Calpain inhibition decreases the growth rate of mammalian cell colonies*. J Biol Chem. **277**: 21474-21479.

- Yang, H. Q., H. Ma, E. Takano, M. Hatanaka and M. Maki. (1994). *Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of mu-calpain large subunit.* J Biol Chem. **269**: 18977-18984.
- Zhang, Z., J. Lawrence and A. Stracher. (1988). *Phosphorylation of platelet actin binding protein protects against proteolysis by calcium dependent sulfhydryl protease.* Biochem Biophys Res Commun. **151**: 355-360.
- Zimmerman, U. J., and W. W. Schlaepfer. (1991). *Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I.* Biochim Biophys Acta. **1080**: 275.