

ECOLE DOCTORALE : **DES GENOMES AUX ORGANISMES**
UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Boulevard François Mitterrand
91025 EVRY cedex

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Mention biologie cellulaire et moléculaire

Etude du complexe CARP-Titine-Calpaïne 3 : de la fonction vers la thérapeutique

Présentée par

Lydie LAURE

GENETHON CNRS FRE 3087
Laboratoire Dystrophies Des Ceintures
1 bis rue de l'Internationale
91000 EVRY

Soutenue le 5 juin 2008

devant les membres du jury composé de :

- ❖ Président : Pr. Francis QUETIER
- ❖ Rapporteur : Pr. Didier ATTAIX
- ❖ Rapporteur : Pr. Terence PARTRIDGE
- ❖ Rapporteur : Pr. Stephen BAGHDIGUIAN
- ❖ Examineur : Dr. Ana FERREIRO
- ❖ Examineur : Dr. Nathalie DANIELE
- ❖ Directeur de thèse : Dr. Isabelle RICHARD

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au docteur Isabelle Richard qui m'a d'abord accueillie dans son laboratoire en 2002 pour un « stage d'initiation à la Recherche » dans le cadre de ma Maîtrise. Finalement, après quelques mois passés dans l'équipe formidable qu'elle dirige, l'initiation s'est prolongée par un stage de DEA et aboutit aujourd'hui, après plus de 5 ans à Généthon, par un diplôme de doctorat. Je souhaite donc exprimer ma reconnaissance à Isabelle qui m'a fait confiance, m'a permis de réaliser cette thèse et m'a donné l'opportunité d'interagir à plusieurs reprises avec la communauté scientifique internationale lors de congrès.

Je tiens ensuite à remercier très sincèrement Marc Bartoli et surtout Nathalie Danièle pour leurs précieux conseils, leur soutien et leurs connaissances théoriques et techniques qu'ils ont bien voulu partager avec moi. Je remercie tout particulièrement Nathalie pour sa disponibilité et ses constants encouragements, pour nos longues discussions scientifiques et personnelles, pour son agréable compagnie lors des séjours à l'étranger dont je garde d'excellents souvenirs et pour m'avoir guidée tout au long de cette période.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux à tous les membres de l'équipe « Dystrophies Des Ceintures » qui ont tous contribué à l'aboutissement de ce travail et qui m'ont permis d'évoluer dans une ambiance très sympathique. Je pense notamment à Carinne Roudaut, Sylvie Marchand, Laurence Suel-Pétat et Nathalie Bourg-Alibert que je qualifierais de « piliers de Généthon ». En plus des nombreuses compétences techniques qu'elles m'ont transmises, elles ont toujours cru en moi et m'ont continuellement encouragée et soutenue. Je tiens à remercier particulièrement Nathalie -ma « colloc de labo »- pour son enthousiasme et sa joie de vivre, pour son réconfort dans les moments douloureux et tout simplement pour son amitié qui m'est chère. Je pense aussi à Jérôme Poupiot et Evelyne Gicquel qui sont venus rejoindre l'équipe peu après mes débuts et à Karine Charton, William Lostal, Shabahang-Soheili Tayebeli alias « Shabi », Azeddine Bentaïb, Jean-Baptiste Boucheteil et Florence Le Roy, les dernières recrues. Je souhaite sincèrement bon courage aux thésards en espérant qu'ils vivront une expérience aussi enrichissante que la mienne. Je n'oublie pas ceux qui sont partis : Mathieu Taveau, Guillaume Sillon, Béatrice Benayoun, Henri Criséo, Sophie Aubert (avec qui « le projet CARP » a démarré), Alain Bernot, Fabrice Raynaud, Astrid Milic, Fanny Noulet, Stéphanie Duguez, Laëtitia Barrault, Delphine Bonnin, Martin Krahn et Gaëlle Blandin.

Je souhaite également remercier l'ensemble du personnel de Généthon et plus particulièrement les membres des services de séquençage, de production de vecteurs, de bioexpérimentation et d'histologie, ainsi que ceux de la plate-forme d'imagerie, du service informatique et l'équipe de l'animalerie.

Je suis très heureuse de remercier l'Association Française contre les Myopathies pour avoir soutenu ce projet et pour m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse. Je garde d'autre part un souvenir inoubliable des cinq téléthons vécus de « l'intérieur » et de l'ambiance festive qui règne à Généthon lors du Calendrier de l'Avent ainsi que pendant les 30 heures. J'en profite pour remercier tous les membres de la « GAP Team » avec qui j'ai partagé de nombreux fous-rires lors des tournages.

Parmi tous les gens exceptionnels que j'ai rencontrés à Généthon, je tiens à remercier très chaleureusement ceux qui sont devenus mes amis. Un grand merci pour leur soutien et pour TOUT le reste... Je pense notamment à Tibo, Ludo, Jéjé, Cristof, Adeline, Laetitia, Sabine, Aurélie, Rachid, Karine, Will, Sandra, Nico, Karim, Séverine, Kelly, Philippe, Lionel et Julie. Je pense aussi à ceux que j'ai rencontrés par leur intermédiaire : Damien, Tibo2, Antoine, Eve, Cécilia, Angéline, Xavier...

Naturellement, j'adresse d'immenses Mercis à ma famille, ma belle-famille et mes fidèles amis pour leur compréhension, leur patience et leur soutien. Les échanges scientifiques n'étant pas tellement leur « tasse de thé », à l'exception de Sarah et d'Olivier : « mes Binômes », je les remercie d'autant plus pour avoir essayé de me comprendre et suivre l'avancée de mes travaux. Je suis donc très touchée par les attentions diverses de Maman et Estelle, Papa, Béb et Guillaume, Karen et Gé, Tio et Céline, Damien et Gaëlle, Fabien et Véro, Philippe et Céline, Karibou (et Pierre), Arnaud, mes cousines Katia, Laetitia, Loeïza et Auriane, Jean-Claude et Christiane, David et Sylvie, Benjamin et Caroline, Anthony et Vanessa, et surtout Jonathan qui m'a supportée pendant ces longues années.

Enfin, je tiens à remercier sincèrement les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, et plus particulièrement Francis Quétier qui a d'abord été mon professeur à l'université, puis mon employeur au GENOSCOPE et finalement, aujourd'hui, le Président de mon jury de thèse.

RESUME

La calpaïne 3, protéase à substrats multiples spécifique du muscle squelettique est déficiente dans les dystrophies des ceintures de type 2A. Bien que sa (ses) fonction(s) reste(nt) à ce jour inconnue(s), il a été suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle dans le remodelage du sarcomère, en particulier lors de la transduction d'un signal mécanique. La calpaïne 3 est localisée en plusieurs points du sarcomère, notamment dans la région élastique N2A. A ce niveau, elle ferait partie d'un complexe moléculaire comprenant les MARPs (Muscle Ankyrin Repeat Proteins), protéines connues pour avoir un rôle de régulateur de la transcription génique dans le cœur.

Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence qu'une des protéines de cette famille, CARP (Cardiac Ankyrin Repeat Protein), est un substrat de la calpaïne 3 *in vitro*. De plus, nous avons démontré que la forme clivée de CARP possède une affinité beaucoup plus élevée pour la région N2A de la titine que la forme non clivée. Ceci a été confirmé *in vivo* par une différence de mobilité de CARP dans la souris déficiente en calpaïne 3. Notre hypothèse est que la calpaïne 3 régule la fonction de CARP en renforçant son interaction avec les sarcomères prévenant ainsi son passage nucléaire et donc son action au niveau de la régulation génique. Nos expériences suivantes ont permis de montrer que : 1) CARP agit sur l'activité de plusieurs facteurs de transcription, parmi lesquels certains (NF- κ B p65 et FoxO1) sont impliqués dans la régulation de la masse musculaire. 2) CARP régule l'expression de protéines impliquées dans le remodelage. 3) CARP est associé à des protéines impliquées dans ces voies. L'ensemble de nos résultats suggère donc que CARP pourrait intervenir dans la plasticité du tissu musculaire. D'autre part, nous proposons que la perte de ce mécanisme pourrait participer à la physiopathologie de la dystrophie des ceintures de type 2A.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que l'expression de CARP augmente systématiquement dans tous les modèles dystrophiques étudiés, suggérant que CARP serait un marqueur essentiel de ces maladies. Le contrôle de sa surexpression dans ces pathologies permettrait d'envisager des solutions thérapeutiques pour ces maladies qu'aucun traitement ne permet de guérir à ce jour.

SOMMAIRE

Remerciements	0
RESUME	3
SOMMAIRE	4
LISTE DES ABREVIATIONS	7
PREAMBULE	11
IINTRODUCTION	12
1 Organisation du muscle strié squelettique	13
1.1 Anatomie du muscle strié squelettique	13
1.1.1 Le muscle squelettique est composé de populations cellulaires variées	13
1.1.2 Le muscle squelettique est protégé par diverses enveloppes	13
1.1.3 Le muscle squelettique est abondamment irrigué et innervé	14
1.2 Structure de la fibre musculaire	15
1.2.1 La fibre musculaire est une cellule hautement spécialisée	15
1.2.2 Les myofibrilles sont composées d'une succession régulière de sarcomères	16
1.2.3 Les protéines des myofilaments constituent le cytosquelette	17
1.3 Différents types de fibres	18
2 Fonctions du muscle strié squelettique	19
2.1 Contrôle du métabolisme	19
2.1.1 Le muscle squelettique participe au contrôle de l'homéostasie glucidique	19
2.1.2 Le muscle squelettique est un réservoir d'acides aminés	20
2.2 La contraction musculaire	20
3 Deux propriétés essentielles du tissu musculaire : capacité régénérative et plasticité	21
3.1 La capacité régénérative du muscle squelettique	22
3.2 Les modifications quantitatives du muscle squelettique	23
3.2.1 L'hypertrophie musculaire	23
3.2.2 L'atrophie musculaire	24
3.3 Les modifications qualitatives du muscle squelettique	24
3.4 Les voies de signalisation impliquées dans le remodelage	25
3.4.1 Les voies de signalisation contrôlant la masse musculaire	25
3.4.2 Les voies stimulées par l'exercice	28
4 Pathologies musculaires	29
4.1 Les dystrophies des ceintures	29
4.2 La titine : une protéine clé du muscle squelettique	31
4.2.1 La titine dans la bande I	31
4.2.2 La titine dans le disque Z	31
4.2.3 La titine dans la ligne M	33
4.3 La calpaïne 3 : une protéase dont la fonction reste imprécise	34
4.3.1 Caractéristiques structurales et biochimiques de la calpaïne 3	34
4.3.2 Localisation et fonction de la calpaïne 3	35
4.4 Un complexe d'intérêt : le complexe C3/titine	36
5 Objectifs et présentation de l'étude	37
RESULTATS	39
1 Etude de la relation fonctionnelle entre la calpaïne 3 et CARP	40
1.1 Contexte	40
1.2 Résultats	40
1.2.1 Clivage de CARP par la calpaïne 3	40
1.2.1.1 CARP est un substrat de la calpaïne 3 <i>in vitro</i>	40
1.2.1.2 La calpaïne 3 et CARP sont capables d'interagir	42

1.2.1.3	Le clivage de CARP n'est pas spécifique de la calpaïne 3	42
1.2.1.4	La calpaïne 3 clive CARP dans une région très structurée.....	43
1.2.2	Conséquences de la coupure de CARP par la calpaïne 3	45
1.2.2.1	Conséquences de la coupure de CARP sur sa localisation.....	45
1.2.2.1.1	Etude de la localisation de CARP.....	45
1.2.2.1.1.1	Localisation de CARP <i>in cellulo</i>	45
1.2.2.1.1.2	Localisation subcellulaire de CARP <i>in vivo</i> dans les muscles de souris.....	47
1.2.2.1.2	Conséquences du clivage sur la localisation.....	47
1.2.2.2	Conséquence du clivage de CARP sur son affinité pour le sarcomère.....	48
1.2.2.3	In vivo, la présence de C3 renforce l'affinité de CARP pour le sarcomère	50
1.3	Conclusion.....	51
2	<i>Caractérisation de la fonction de CARP dans le muscle squelettique</i>	52
2.1	Contexte	52
2.2	Résultats.....	52
2.2.1	Effets de la surexpression de CARP dans des cellules musculaires.....	52
2.2.1.1	Effet de CARP sur l'activité de facteurs de transcription.....	52
2.2.1.1.1	Criblage des facteurs de transcription régulés en présence de CARP	52
2.2.1.1.2	Validation et quantification des résultats	53
2.2.1.2	Effet de CARP sur l'expression de gènes.....	55
2.2.2	Recherche des partenaires de CARP dans le muscle squelettique	60
2.2.2.1	Identification de partenaires potentiels par système de double-hybride	60
2.2.2.2	Confirmation des résultats	61
2.3	Conclusion.....	64
3	<i>CARP dans la physiopathologie musculaire</i>	65
3.1	Contexte	65
3.2	Résultats.....	65
3.2.1	Expression de CARP dans les muscles de modèles animaux	65
3.2.1.1	Modèles de dystrophies musculaires.....	65
3.2.1.2	Modèles d'atrophie consécutive à une dénervation.....	68
3.2.1.3	Modèle d'atrophie induite par une diète prolongée.....	70
3.2.2	Effet de la surexpression de CARP <i>in vivo</i>	71
3.2.2.1	Effet de CARP sur le poids des muscles, le diamètre des fibres et l'apoptose.....	71
3.2.2.2	Effet de CARP sur les différents types de fibres.....	74
3.2.3	Vers la thérapeutique	76
3.2.3.1	Inhibition de CARP par stratégie anti-sens : preuve de principe.....	76
3.2.3.2	Analyse <i>in silico</i> du promoteur du gène de CARP	80
3.3	Conclusion.....	81
	DISCUSSION	83
1	<i>Fonctions de la calpaïne 3 dans la plasticité musculaire</i>	84
1.1	Régulation fonctionnelle de CARP par la calpaïne 3	84
1.2	Fonction(s) de la voie impliquant la calpaïne 3 et CARP	86
1.2.1	Hypothèses sur les mécanismes moléculaires de la régulation génique par CARP	86
1.2.2	Mécanismes physiologiques régulés par CARP.....	87
	□ Régulation de la prolifération cellulaire	88
	□ Contrôle des changements qualitatifs de la fibre	90
	□ Contrôle de l'homéostasie protéique.....	90
	□ Rôle potentiel dans le contrôle du remodelage	91
1.2.3	Activation de la voie calpaïne 3/CARP	91
1.2.4	Conclusion	93
2	<i>Physiopathologie musculaire et approches thérapeutiques</i>	94
2.1	Rôle de CARP dans la physiopathologie des pathologies musculaires.....	94
2.2	Rôle de FoxO1 dans la physiopathologie de la LGMD2A.....	96
2.3	Approches thérapeutiques.....	98
3	<i>Conclusions et perspectives</i>	99

MATERIEL ET METHODES	100
<i>Fiche technique n°1</i> : Plasmides, clonages et production d'AAV recombinants.....	101
<i>Fiche technique n°2</i> : Culture cellulaire et transfections	108
<i>Fiche technique n°3</i> : Extraction des protéines et analyses	110
<i>Fiche technique n°4</i> : Système de double hybride chez la levure	114
<i>Fiche technique n°5</i> : Immunomarquages et imagerie.....	116
<i>Fiche technique n°6</i> : Expérimentation animale.....	120
<i>Fiche technique n°7</i> : Dosage de l'activité de facteurs de transcription	122
<i>Fiche technique n°8</i> : Extraction d'ARN et PCR quantitative en temps réel.....	124
<i>Fiche technique n°9</i> : Etude du transcriptome	127
BIBLIOGRAPHIE	129
PUBLICATIONS	147

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV	<u>A</u> deno- <u>A</u> ssociated <u>V</u> irus
ADAM	<u>A</u> <u>D</u> isintegrin <u>A</u> nd <u>M</u> etalloprotease
ADN	<u>A</u> cide <u>D</u> esoxyribo <u>N</u> ucléique
ADNc	<u>A</u> cide <u>D</u> esoxyribo <u>N</u> ucléique <u>c</u> omplémentaire
AMP	<u>A</u> cide <u>M</u> ono <u>P</u> hosphate
AMPK	<u>A</u> cide <u>M</u> ono <u>P</u> hosphate <u>K</u> inase
Ankrd2	<u>A</u> nkyrin <u>r</u> epet protein <u>d</u> omain <u>2</u>
AP-1	<u>A</u> ctivator <u>P</u> rotein <u>1</u>
APPL1	<u>A</u> daptator protein containing <u>p</u> H domain, <u>P</u> TB domain and <u>L</u> eucine zipper motif <u>1</u>
ARNm	<u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>N</u> ucléique <u>m</u> essenger
AS160	<u>A</u> kt <u>S</u> ubstrate of <u>160</u> kilodaltons
ASH2L	<u>A</u> bsent, <u>S</u> mall or <u>H</u> omeotic- <u>L</u> ike protein <u>2</u>
Asn	<u>A</u> sparagine
ATF2	<u>A</u> ctivating <u>T</u> ranscription <u>F</u> actor <u>2</u>
ATG	<u>A</u> dénine <u>T</u> hymine <u>G</u> uanine
ATP	<u>A</u> dénosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate
BCA	<u>B</u> i <u>C</u> inchoninic <u>A</u> cid
BLAST	<u>B</u> asic <u>L</u> ocal <u>A</u> lignment <u>S</u> earch <u>T</u> ool
C1 ou μ CL	<u>C</u> alpaïne <u>1</u> ou <u>m</u> icro <u>C</u> a <u>L</u> païne
C2 ou mCL	<u>C</u> alpaïne <u>2</u> ou <u>m</u> illi <u>C</u> a <u>L</u> païne
C3	<u>C</u> alpaïne <u>3</u>
CaMK	calcium/ <u>C</u> a <u>M</u> odulin-dependent protein <u>K</u> inase
CARP	<u>C</u> ardiac <u>A</u> nkyrin <u>R</u> epet <u>P</u> rotein
CDK	<u>C</u> yclin- <u>D</u> ependent <u>K</u> inase
c-FLIP	<u>c</u> ellular <u>F</u> LICE- <u>I</u> nhibitory <u>P</u> rotein
CHO	<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary
CKIP-1	<u>C</u> asein <u>K</u> inase <u>2</u> - <u>I</u> nteracting <u>P</u> rotein- <u>1</u>
COUP-TFII	<u>C</u> hicken <u>O</u> valbumin <u>U</u> pstream <u>P</u> romoter <u>T</u> ranscription <u>F</u> actor <u>II</u>
Csq	<u>C</u> ytos <u>q</u> uelette
C ter	<u>C</u> arboxy <u>t</u> erminal ou <u>C</u> OOH- <u>t</u> erminal
Cul3	<u>C</u> ulline <u>3</u>
Cys	<u>C</u> ystéine
Da, kDa, MDa	<u>D</u> alton, <u>k</u> ilo <u>D</u> alton, <u>M</u> ega <u>D</u> alton
DAB	<u>D</u> i <u>A</u> mino-3,3' <u>B</u> enzidine
DAPI	4'-6'- <u>D</u> i <u>A</u> midino-2- <u>P</u> henyl <u>I</u> ndole
DARP	<u>D</u> iabet related <u>A</u> nkyrin <u>R</u> epet <u>P</u> rotein
DCM	<u>D</u> ilated <u>C</u> ardio <u>M</u> yopathy
DII1	<u>D</u> elta- <u>l</u> ike <u>1</u>
DMD	<u>D</u> ystrophie <u>M</u> usculaire de <u>D</u> uchenne
DMEM	<u>D</u> ubelcco's <u>M</u> odifies <u>E</u> agle <u>M</u> edium

DO	<u>D</u> ensité <u>O</u> ptique
DTT	<u>D</u> i- <u>T</u> hio <u>T</u> reitol
DYRK	<u>D</u> ual specificity <u>Y</u> ak1- <u>R</u> elated <u>K</u> inase
E2F-1	<u>E</u> arly-region- <u>2</u> transcription <u>F</u> actor <u>1</u>
EDL	<u>E</u> xtensorum <u>D</u> igitorum <u>L</u> ongus
EDTA	<u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid
eIF-4 ^E	<u>e</u> karyotic translation <u>I</u> nitiation <u>F</u> actor <u>4E</u>
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
EOPS	<u>E</u> xempte d' <u>O</u> rganismes <u>P</u> athogènes <u>S</u> pécifiques
EST	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equence <u>T</u> ags
eYFP	<u>e</u> nhanced <u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
FATZ	<u>F</u> ilamine, alpha- <u>A</u> ctinine and <u>T</u> elethonin associated <u>Z</u> disc proteins
FHL2	<u>F</u> our and <u>H</u> alf <u>L</u> im protein <u>2</u>
FKHD	<u>F</u> or <u>K</u> Head
FKRP	<u>F</u> u <u>K</u> utin <u>R</u> elated <u>P</u> rotein
FNIII	<u>F</u> ibro <u>N</u> ectine de type <u>III</u>
FoxO	<u>F</u> orkhead <u>box</u> -containing protein <u>O</u> subfamily
FRAP	<u>F</u> luorescent <u>R</u> ecovery <u>A</u> fter <u>P</u> hoto <u>B</u> leaching
FREAC	<u>F</u> orkhead <u>R</u> elated <u>A</u> ctivator transcription factor
GDF8	<u>G</u> rowth and <u>D</u> ifferentiation <u>F</u> actor <u>8</u>
GDI	<u>G</u> DP- <u>D</u> issociation <u>I</u> nhibitor
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
GluR-1	<u>G</u> lutamate <u>R</u> eceptor subunit <u>1</u>
GLUT4	<u>GL</u> ucose <u>T</u> ransporter <u>4</u>
GSK3β	<u>G</u> lycogen <u>S</u> ynthase <u>K</u> inase <u>3 beta</u>
GST	<u>G</u> lutathione <u>S</u> <u>T</u> ransférase
His	<u>H</u> istidine
HMERF	<u>H</u> ereditary <u>M</u> yopathy with <u>E</u> arly <u>R</u> espiratory <u>F</u> ailure
HPS	<u>H</u> ématoxyline – <u>P</u> hloxine - <u>S</u> afran
HRP	<u>H</u> orse <u>R</u> adish <u>P</u> eroxydase
HSP	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein
Ig	<u>I</u> mmunoglobuline
IGF1	<u>I</u> nsulin-like <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
IKK	<u>I</u> <u>K</u> appa <u>B</u> <u>K</u> inase
IL1	<u>I</u> nter <u>L</u> eukine <u>1</u>
IS1	<u>I</u> nsertion <u>S</u> equence <u>1</u>
IS2	<u>I</u> nsertion <u>S</u> equence <u>2</u>
ITR	<u>I</u> nverted <u>T</u> erminal <u>R</u> epeat
JNK	<u>c</u> - <u>J</u> un <u>NH</u> 2-terminal <u>K</u> inase
Kctd7	<u>P</u> otassium (<u>K</u>) <u>c</u> hannel <u>t</u> etramerisation <u>d</u> omain containing 7
KO	<u>K</u> nock <u>O</u> ut
Leu	<u>L</u> eucine
LGMD	<u>L</u> imb <u>G</u> irdle <u>M</u> uscular <u>D</u> ystrophy
LIM	<u>L</u> in-11 <u>I</u> sl-1 <u>M</u> ec-3
MAFbx	<u>M</u> uscle <u>A</u> trogen <u>E</u> - <u>box</u>

MAPK	<u>Mitogen-Activated Protein Kinase</u>
MARP	<u>Muscle Ankyrin Repeat Protein</u>
MDM	<u>Muscular Dystrophy Myositis</u>
MEF	<u>Myocyte Enhancer Factor</u>
Mex5	Ligne <u>M</u> <u>exon 5</u>
min	<u>minute</u>
MLC-2V	<u>Myosin Light Chain 2 Ventricular specific</u>
MLP	<u>Muscle LIM Protein</u>
µg, mg	<u>microgramme, milligramme</u>
µL, mL	<u>microLitre, milliLitre</u>
µm, mm, cm, nm	<u>micromètre, millimetre, centimètre, nanomètre</u>
mM	<u>milliMolaire</u>
MM	<u>Masse Moléculaire</u>
MOPS	<u>MOrpholino PropaneSulfonic acid</u>
MRF4	<u>Myogenic Regulatory Factor 4</u>
mTOR	<u>mammalian Target Of Rapamycin</u>
MuRF1	<u>Muscle Ring Finger protein 1</u>
MuSEAP	<u>murine Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase</u>
MYBP-C	<u>MYosin Binding Protein C</u>
Myf5	<u>myogenic determination factor 5</u>
MYL1	<u>MYosin Light polypeptide 1</u>
MyoD	<u>Myogenic Determination factor</u>
MYOM2	<u>MYOMesin 2</u>
Neurl	<u>Neuralized-like</u>
NFAT	<u>Nuclear Factor of Activated T cells</u>
NF-κB	<u>Nuclear Factor kappaB</u>
NLS	<u>Nuclear Localisation Signal</u>
NR2F2	<u>Nuclear Receptor subfamily 2, group F, member 2</u>
NS	<u>N terminal Sequence</u>
N ter	<u>NH2-terminal</u>
PANTHER	<u>Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships</u>
pb, kb	<u>paire de bases, kilopaire de bases</u>
PBS	<u>Phosphate Buffered Saline</u>
PBS	<u>Predicted Biological Score</u>
PCR	<u>Polymerase Chain Reaction</u>
PKD1	<u>Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1</u>
PEI	<u>PolyEthylèneImine</u>
PEST	<u>Proline (P) Acide glutamique (E) Serine (S) Thréonine (T)</u>
PEVK	<u>Proline (P) Acide glutamique (E) Valine (V) Lysine (K)</u>
PGC-1α	<u>Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Co-activator 1 alpha</u>
PI ₃ K	<u>PhosphatidyInositol-3-Kinase</u>
PKB/ Akt	<u>Protein Kinase B</u>
PKC	<u>PhosphoKinase C</u>
PLZF	<u>Promyelocytic Leukemia Zinc Finger</u>
PML	<u>ProMyelocytic Leukemia protein</u>

PO	<u>PhosphO</u> protein
POMT1	<u>Protein O-Mannosyl T</u> ransferase <u>1</u>
PVDF	<u>PolyVinyliDene F</u> luoride
Ral	<u>Rudimenta</u> l (chez la drosophile)
REPS	<u>Ra</u> IPB 1 associated <u>EPS</u> domain containing
Rho	<u>Ras</u> -related <u>h</u> omologue
Rho-GDI	<u>Rho GDP D</u> issociation <u>I</u> nhibitor
RISC	<u>RNA-Induced S</u> ilencing <u>C</u> omplex
ROI	<u>Region O</u> f <u>I</u> nterest
rpm	<u>rotations par m</u> inute
RT	<u>Room T</u> emperature
RT	<u>Reverse T</u> ranscription
RT-PCRQ	<u>Real T</u> ime <u>Polymerase C</u> hain <u>R</u> eaction <u>Q</u> uantitative
RyR1	<u>Ryanodin R</u> eceptor <u>1</u>
SAGE	<u>S</u> erial <u>A</u> nalysis of <u>G</u> ene <u>E</u> xpression
SCF	<u>Skp-Cullin-F</u> box
SDS	<u>Sodium D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
SHIP2	<u>SH2</u> -containing <u>I</u> nositol 5'- <u>P</u> hosphatase <u>2</u>
shRNA	<u>s</u> mall <u>h</u> airpin <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
SIDA	<u>S</u> yndrome d' <u>I</u> mmuno- <u>D</u> éficience <u>A</u> cquise
siRNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid
Sol	<u>Soleus</u>
STAT	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducers and <u>A</u> ctivators of <u>T</u> ranscription
SVF	<u>S</u> érum de <u>V</u> eau <u>F</u> œtal
TA	<u>T</u> ibialis <u>A</u> nterior
Tcap	<u>T</u> elethonin <u>cap</u>
TGFβ	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>β</u>
TMD	<u>T</u> ibial <u>M</u> uscular <u>D</u> ystrophy
TNFα	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>α</u>
TRAF2	<u>T</u> NF <u>R</u> eceptor- <u>A</u> ssociated <u>F</u> actor <u>2</u>
Trim32	<u>T</u> ripartite- <u>m</u> otif-containing protein <u>32</u>
Trp	<u>T</u> ryptophane
TTBS	<u>T</u> ween <u>I</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
TTN	<u>TiTiNe</u>
TULP3	<u>T</u> ubby <u>L</u> ike <u>P</u> rotein <u>3</u>
TUNEL	<u>T</u> erminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin <u>N</u> ick <u>E</u> nd <u>L</u> abeling
UTR	<u>U</u> n <u>T</u> ranslated <u>R</u> egion
Vcam1	<u>V</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule <u>1</u>
YB1	<u>Y</u> box <u>B</u> inding protein <u>1</u>
YY1	<u>Y</u> in <u>Y</u> ang <u>1</u>

PRÉAMBULE

Cette étude s'inscrit dans le cadre des travaux de l'équipe « Dystrophies des Ceintures » du laboratoire GENETHON. Le projet fait suite à l'identification, par le groupe en 1995, du gène responsable de la dystrophie des ceintures de type 2A. Une des orientations privilégiées du laboratoire est ainsi devenue la caractérisation du rôle biologique de la calpaïne 3, déficiente dans cette pathologie, et le développement de solutions thérapeutiques pour cette dystrophie.

Depuis quelques années, le projet de l'équipe s'est étendu à l'étude des différentes formes de dystrophies des ceintures. Ces maladies constituent un groupe de dystrophies musculaires, c'est-à-dire de maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence musculaire conduisant à une altération et à une perte des fonctions locomotrices. Cliniquement et génétiquement hétérogènes, elles atteignent préférentiellement les muscles proximaux des ceintures pelvienne et scapulaire. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement pour ces dystrophies. Il est donc urgent d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques. Plusieurs axes de recherche sont actuellement développés dans le laboratoire afin d'améliorer le diagnostic et d'identifier des cibles d'intérêt pour établir des traitements: (i) l'étude moléculaire de ces maladies, (ii) l'étude de la spécificité d'atteinte, (iii) la recherche de solutions thérapeutiques pour corriger à la « source » (comme le transfert du gène sain), pour consolider le muscle ou au minimum ralentir sa dégénérescence.

Les travaux, décrits dans ce mémoire, devraient permettre d'approfondir les connaissances fondamentales sur le muscle squelettique et d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques pour les dystrophies des ceintures mais également pour d'autres maladies musculaires.

INTRODUCTION

Le corps humain est composé de quatre types majeurs de tissus : le tissu épithélial, le tissu conjonctif, le tissu nerveux et le tissu musculaire. Le tissu musculaire constitue à lui seul environ 40 % du poids sec du corps. Capables de générer un travail mécanique à partir d'énergie chimique, les muscles striés squelettiques permettent les mouvements, et les muscles lisses ainsi que le muscle cardiaque sont indispensables à certaines fonctions vitales telles que la respiration, la circulation sanguine ou encore la digestion.

Près de 650 muscles squelettiques de formes et de tailles variées recouvrent l'ensemble de l'ossature. La force contractile exercée par ces muscles permet aux segments du squelette auxquels ils sont attachés de pivoter autour de leurs articulations. Le tissu musculaire squelettique constitue ainsi l'organe du mouvement volontaire (motricité cinétique) mais également du maintien d'une posture (motricité statique).

1 Organisation du muscle strié squelettique

1.1 Anatomie du muscle strié squelettique

1.1.1 Le muscle squelettique est composé de populations cellulaires variées

Des types cellulaires variés participent à la composition du muscle. En moyenne, un muscle squelettique est constitué de quelques dizaines à quelques milliers de **fibres musculaires** (ou myofibrilles ou myotubes), de 10 à 100 µm de diamètre et pouvant atteindre plusieurs centimètres de long. Les fibres musculaires sont plurinucléées et peuvent être assimilées à de longues formes cylindriques. Elles se terminent à leurs extrémités par des filaments de collagène, qui, regroupés, forment les tendons et assurent la fixation du muscle sur ses points d'insertion (*figure 1*).

De petite taille et de forme aplatie, les **cellules satellites**, également spécifiques du muscle, sont mononucléées et sont situées entre la lame basale et la membrane plasmique, à la périphérie des fibres musculaires. Dans le muscle adulte, elles représentent une population de cellules indifférenciées mais caractérisées par leur détermination myogénique ; elles interviennent notamment lors de la régénération musculaire. Enfin, des cellules non-spécifiques, telles que les neurones, les adipocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules du système immunitaire, participent à l'organisation et à l'intégrité de ce tissu.

1.1.2 Le muscle squelettique est protégé par diverses enveloppes

Plusieurs couches de tissus conjonctifs séparent et protègent les composants des muscles squelettiques. L'**endomysium** entoure chaque fibre musculaire, le **pérимysium** organise de 10 à 100 fibres musculaires en faisceaux et l'**épимysium**, appelé plus fréquemment aponévrose, forme la couche extérieure solide qui enveloppe tout le muscle (*figure 1*). Ce sont les nombreuses fibres de collagène du pérимysium qui se prolongent pour participer à la formation des jonctions myotendineuses (Light and Champion, 1984).

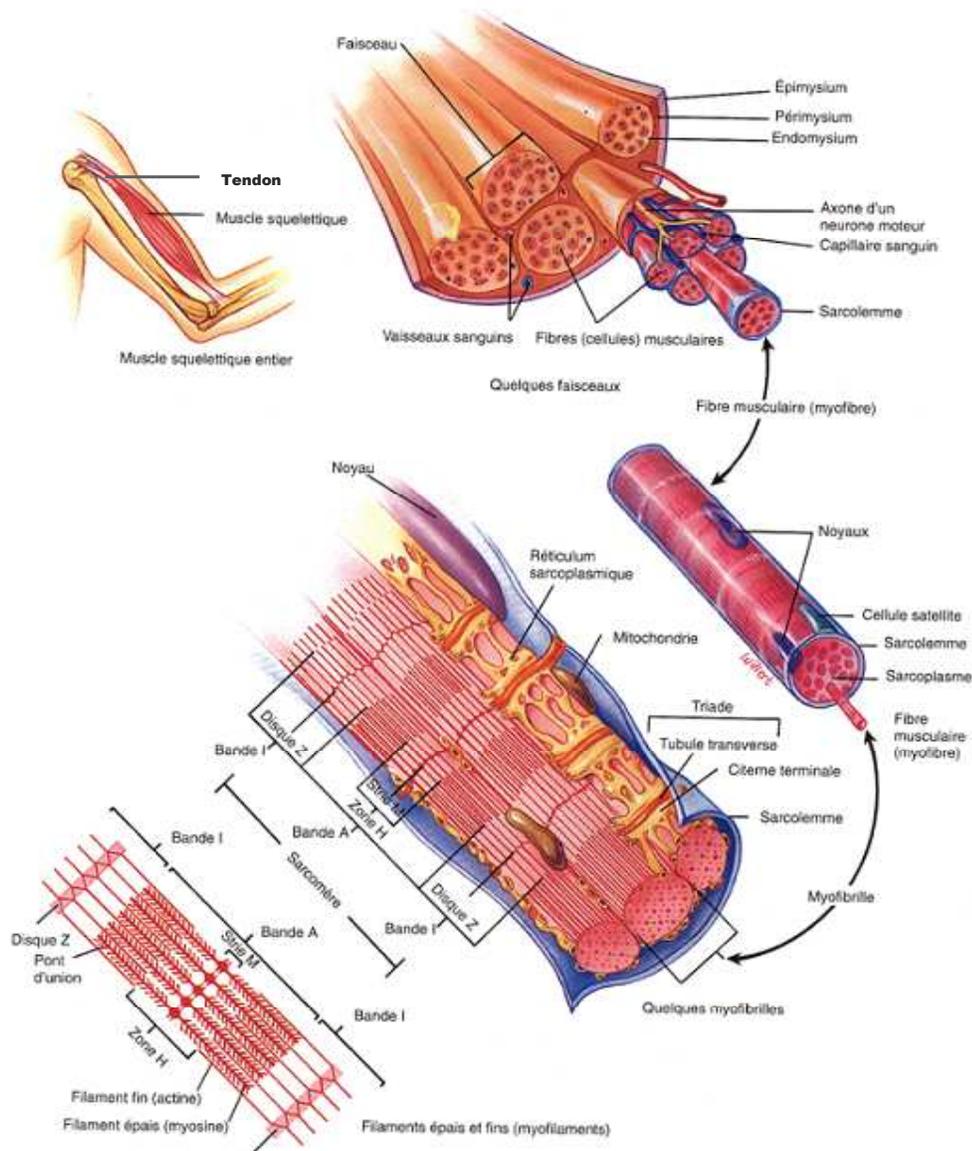


Figure 1 : Anatomie du muscle squelettique et structure de la fibre musculaire

D'après Tortora *et al*, 1994

1.1.3 Le muscle squelettique est abondamment irrigué et innervé

Afin d'assurer ses fonctions physiologiques, le muscle strié squelettique contient un réseau complexe de nerfs permettant l'innervation sensitive et motrice et de vaisseaux sanguins assurant l'irrigation (figure 1) (Sandow, 1970). Celle-ci permet d'apporter au muscle l'oxygène nécessaire à la génération d'énergie et d'évacuer les résidus issus du travail musculaire.

L'innervation sensitive est assurée par les fuseaux neuromusculaires, petites fibres spécialisées réparties dans la masse du muscle. Ces cellules captent les informations relatives aux variations de longueur et de tension musculaire au niveau de leurs récepteurs sensoriels et transmettent cette information au système nerveux par l'intermédiaire des terminaisons nerveuses afférentes. Dans la moelle épinière, les

messages afférents donnent naissance à des messages efférents qui coordonnent l'activité des effecteurs musculaires. Ces systèmes de contrôle de l'activité musculaire sont utilisés pour le maintien de la posture.

L'innervation motrice des fibres musculaires est assurée par des motoneurones. Ce système est sollicité lors du contrôle de la posture, mais également dans les mouvements volontaires. Le motoneurone possède un axone qui se divise en plusieurs branches au voisinage des fibres musculaires et entre en contact avec la membrane cellulaire au niveau d'une synapse appelée **plaque motrice** terminale ou jonction neuromusculaire (figure 2). Bien que chaque fibre ne soit innervée que par une seule terminaison nerveuse, le nombre de fibres musculaires branchées sur un motoneurone varie en fonction du type musculaire. Une unité motrice est constituée par l'ensemble fonctionnel comprenant un motoneurone et les fibres qu'il innerve. D'une façon générale, toutes les fibres d'une unité motrice sont du même type métabolique et fonctionnent simultanément (Burke *et al.*, 1971; Wakeling *et al.*, 2002).

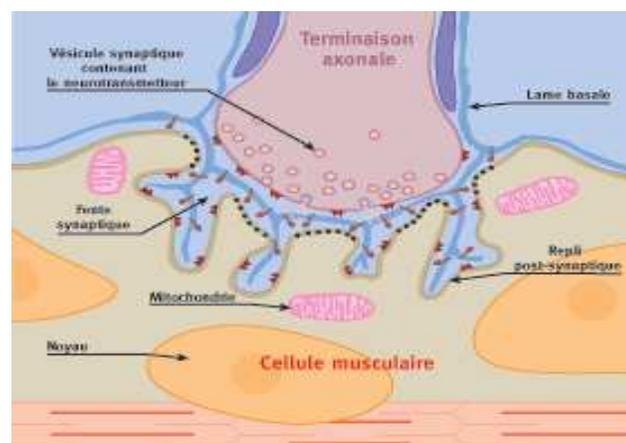


Figure 2 : Représentation schématique de la plaque motrice

1.2 Structure de la fibre musculaire

1.2.1 *La fibre musculaire est une cellule hautement spécialisée*

Chaque myofibre, entité cellulaire du tissu musculaire squelettique, est formée de la fusion de plusieurs centaines de cellules musculaires -ou myoblastes- en un **syncytium plurinucléé**. Les nombreux noyaux de ces cellules sont situés à la périphérie du cytoplasme (sarcoplasme), accolés à la membrane plasmique. Cette membrane, connue sous le nom de sarcolemme, est doublée d'une lame basale. La fibre musculaire contient tous les organites et inclusions cellulaires classiques tels que l'appareil de Golgi, les vésicules, les nombreuses mitochondries, le réticulum endoplasmique lisse (encore appelé réticulum sarcoplasmique) et le réticulum endoplasmique rugueux. Elle contient en outre des molécules assurant le stockage du glucose (glycogène) et de l'oxygène intracellulaire (myoglobine).

Le réticulum sarcoplasmique, compartiment spécialisé dans le stockage et la libération du calcium, émet des protubérances appelées citernes terminales. L'association de deux citernes terminales adjacentes avec un tubule T (invagination du sarcolemme, également appelée tubule transverse) forme une structure caractéristique appelée triade. A l'intérieur du sarcoplasme, le réticulum sarcoplasmique entoure les unités de base de la contraction musculaire, **les myofibrilles** (figure 1).

1.2.2 Les myofibrilles sont composées d'une succession régulière de sarcomères

D'une longueur identique à celle de la fibre, les myofibrilles ont un diamètre de 1 à 3 μm et occupent la quasi-totalité du volume interne de la fibre. Leur organisation répétée caractéristique est à l'origine de l'appellation générique « muscle strié » donnée au tissu qu'elles composent. En effet, leur apparence en microscopie électronique révèle une striation transversale périodique due à l'alternance de bandes claires (ou I pour isotopes) et sombres (ou A pour anisotropes). Les bandes I et A présentent, en leur milieu respectif, le disque Z et la ligne M (figures 1 et 3).

Le **sarcomère**, structure élémentaire délimitée par deux disques Z adjacents, constitue l'unité de base de la contraction musculaire (Huxley, 1969). Chaque sarcomère est composé d'un faisceau de myofilaments parallèles au grand axe de la fibre. La répartition de deux populations de myofilaments (filaments fins d'actine et filaments épais de myosine) détermine, du fait de leurs densités respectives, les régions du sarcomère définies plus haut.

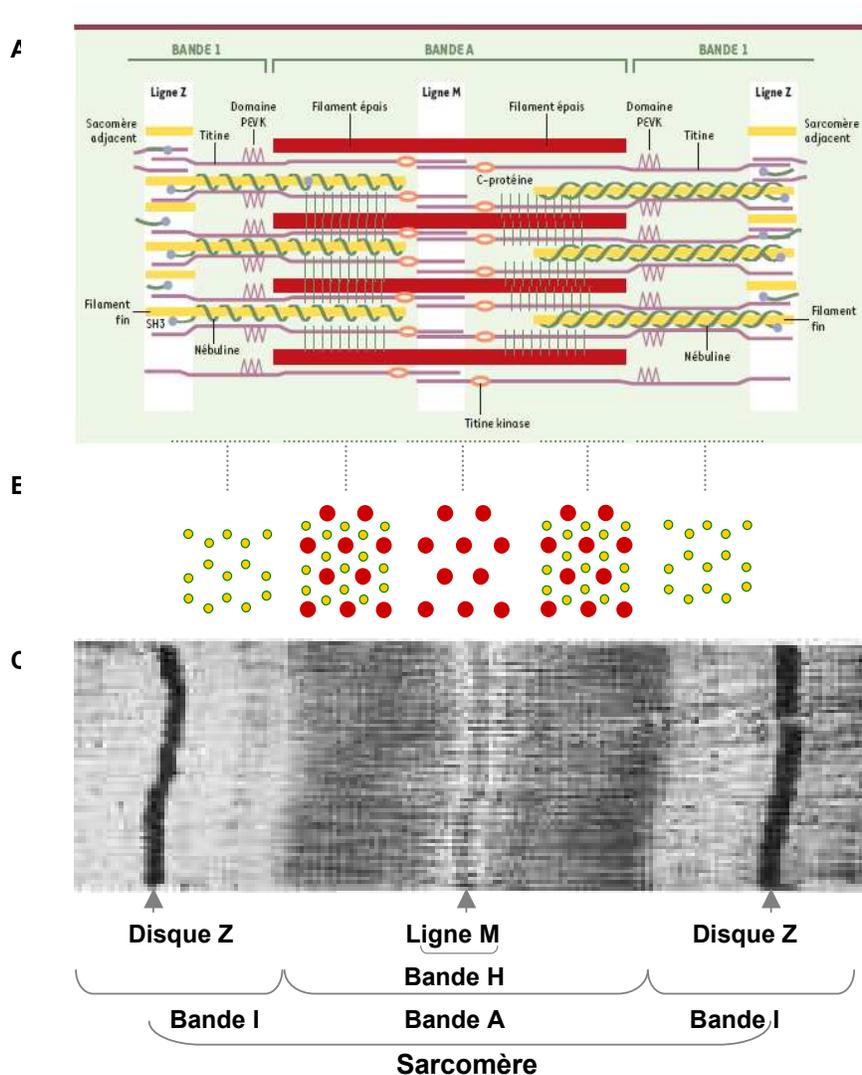


Figure 3 : Organisation du sarcomère

A/ Représentation schématique d'un sarcomère **B/** Représentation transversale de l'organisation des myofilaments fins et épais en myofibrilles à différents niveaux du sarcomère **C/** Photographie d'un sarcomère obtenue par microscopie électronique

Les filaments épais sont disposés au milieu du sarcomère, au niveau de la bande A. Dans la bande plus claire H, ils sont seuls présents. La ligne M interrompt la bande H en son milieu et correspond au renflement médian dû à la liaison des filaments de myosine entre eux. En revanche, dans les parties latérales de la bande A, les filaments fins et épais se chevauchent, les filaments fins étant disposés entre les filaments épais selon un mode hexagonal régulier (figure 3 B). Au niveau de la bande I, les filaments fins sont seuls présents. Le disque Z est marqué par l'interpénétration sur une faible distance des extrémités des filaments fins de deux sarcomères contigus (figure 3). De façon remarquable, les sarcomères des différentes myofibrilles sont alignés selon leur axe longitudinal, ce qui permet d'assurer la coordination de leur recrutement lors de la contraction musculaire.

1.2.3 Les protéines des myofilaments constituent le cytosquelette

Les filaments épais sont essentiellement formés de l'assemblage régulier de molécules de **myosine**. Les lignes M renferment un faible nombre de partenaires protéiques, parmi lesquels la myoméline, la protéine M et la titine, qui assurent ensemble le maintien de la structure de cette région.

Les filaments fins sont formés de l'association de polymères d'**actine** associés à des molécules de tropomyosine (Wegner, 1979) et de troponine (Ebashi et Kodama, 1966). Parmi les nombreuses autres molécules associées aux filaments d'actine, la tropomoduline, protéine chaperone de l'actine, coiffe et stabilise l'extrémité libre des filaments fins (Babcock et Fowler, 1994). Les disques Z sont constitués d'un réseau protéique complexe, dans lequel on trouve des protéines de structure, mais également des molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire (Faulkner *et al.*, 2001). L'alpha-actinine est essentielle à l'organisation du sarcomère, puisqu'elle permet de relier l'extrémité des filaments fins de chaque sarcomère entre eux et aux filaments fins du sarcomère adjacent (Puszkin *et al.*, 1977). Le disque Z contient également les filaments intermédiaires de **desmine**, qui participent également à la liaison des myofibrilles les unes aux autres (Granger et Lazarides, 1979), et la **nébuline**, qui servirait non-seulement de matrice pour la mise en place de la bande I mais qui serait aussi impliquée dans la transduction de signaux, la régulation de la contraction et la transmission de la force (McElhinny *et al.*, 2003).

La **titine** est la plus grande protéine du vivant (environ 3,5 MDa) et s'étend à elle seule sur un demi-sarcomère, du disque Z à la ligne M (Wang *et al.*, 1979). Cette protéine a une structure hautement répétitive (90% de répétitions Immunoglobuline (Ig) et FibroNectine de type III (FNIII) (Labeit et Kolmerer, 1995)) avec cependant 17 régions uniques qui ne présentent aucune homologie avec des séquences connues et un domaine kinase. Molécule ayant des propriétés intrinsèques d'élasticité, elle oppose une résistance à l'étirement excessif du sarcomère et participe également au maintien de l'alignement des filaments fins et épais. La titine est reliée 1) à l'actine par l'intermédiaire de l' α -actinine au niveau du disque Z (Ohtsuka *et al.*, 1997; Sorimachi *et al.*, 1997a) et 2) à la myosine (Houmeida *et al.*, 1995; Soteriou *et al.*, 1993) par l'intermédiaire de la myoméline et de la protéine M au niveau de la ligne M (Obermann *et al.*, 1996) et par interaction directe (Muhle-Goll *et al.*, 2001) ou par l'intermédiaire de MYBP-C (Freiburg et Gautel, 1996) tout le long des filaments épais.

La transmission de la force mécanique de l'intérieur vers l'extérieur de la fibre musculaire requiert une liaison de ce **cytosquelette** interne à la matrice extracellulaire. Cette fonction est assurée par deux complexes multi-protéiques : les costamères et les jonctions myotendineuses (Tidball, 1991). Les costamères sont responsables de l'ancrage latéral des myofibrilles tandis que les jonctions myotendineuses, situées à l'extrémité des myofibrilles, permettent leur ancrage longitudinal.

Le muscle squelettique possède donc un cytosquelette cellulaire fortement adapté à sa fonction de générateur et de transmetteur de force mécanique. D'autre part, le muscle strié possède également un cytosquelette nucléaire particulier, nécessaire pour assurer le maintien de la structure nucléaire lors des sollicitations mécaniques du muscle. En plus de leurs rôles structuraux, les cytosquelettes musculaires, qui mettent en jeu des édifices moléculaires complexes, servent de plate-forme pour de nombreuses protéines participant aux voies de transduction du signal.

1.3 Différents types de fibres

Afin d'assurer ses rôles physiologiques, le muscle squelettique utilise comme source d'énergie l'Adénosine-TriPhosphate (ATP), qu'il est capable de synthétiser en utilisant différentes voies métaboliques. Les **fibres oxydatives** produisent de l'ATP par le système aérobie (oxygène requis), tandis que les **fibres glycolytiques** utilisent le système anaérobie (ne nécessitant pas la présence d'oxygène). Cette diversité permet au muscle de s'adapter à différentes sollicitations, notamment parce que les vitesses de contraction et la résistance à la fatigue diffèrent d'un type à l'autre. Ces différences sont principalement dues à l'existence de plusieurs isoformes des chaînes lourdes de myosine qui composent ces fibres. Il existe ainsi des myosines dites « rapides » et des myosines dites « lentes », dont la distribution est variable en fonction du type de fibre. En prenant en considération leurs caractéristiques physiologiques et métaboliques, et notamment leur teneur en activité ATPasique, trois types principaux de fibres musculaires squelettiques ont pu être distinguées (Burke *et al.*, 1973; Payne *et al.*, 1975).

- ❖ **Les fibres de type I** -ou fibres rouges- sont des fibres oxydatives à contraction lente et résistantes à la fatigue. Toutes les structures nécessaires à l'apport et l'utilisation de l'oxygène -capillaires, myoglobine (protéine utilisée pour le transport de l'oxygène et responsable en grande partie de la coloration des fibres), et mitochondries- sont abondamment représentées dans ce type de fibres qui contiennent principalement la forme lente de myosine.
- ❖ **Les fibres de type IIA** -ou fibres intermédiaires- sont des fibres oxydatives à contraction rapide et résistantes à la fatigue. Elles contiennent aussi beaucoup de capillaires, de myoglobine et de mitochondries, mais se différencient des fibres de type I par la prépondérance de myosine rapide.
- ❖ **Les fibres de type IIB** -ou fibres blanches- sont des fibres glycolytiques à contraction rapide et sensibles à la fatigue. Elles contiennent peu de capillaires, de myoglobine et de mitochondries, mais bénéficient en contrepartie d'une haute teneur en glycogène, forme de réserve glucidique utilisée comme substrat lors de la synthèse anaérobie de l'ATP par la voie glycolytique. L'isoforme de myosine rapide est aussi majoritaire dans ce type de fibres.

Bien qu'il existe des exceptions d'importance (citons le cas du soleus qui contient presque exclusivement des fibres de type I et le psoas des fibres de type II), la plupart des muscles squelettiques est composée d'une combinaison des trois types de fibres. Lors de la contraction, les fibres sont recrutées préférentiellement en fonction du stimulus reçu. Un effort léger active essentiellement les fibres de type I (contraction lente), tandis qu'une activité musculaire plus intense sollicite les fibres à contraction rapide de type IIB (contraction forte) et un effort soutenu nécessite l'intervention des fibres IIA, plus résistantes à la fatigue.

La formation des fibres musculaires et la mise en place des différents types de fibres se déroulent progressivement au cours du développement embryonnaire. Une première étape aboutit à la formation de fibres primaires, qui ont des caractéristiques de fibres lentes, puis une deuxième vague de différenciation myogénique, coïncidant avec la mise en place de l'innervation, donne naissance aux fibres secondaires aux caractéristiques rapides (Condon *et al.*, 1990). Cependant le statut d'une fibre n'est pas acquis de manière définitive et peut être modifié pour s'adapter aux sollicitations mécaniques imposées au muscle. Ainsi, lors d'un exercice d'endurance, certaines fibres glycolytiques (type IIB) sont modifiées graduellement en fibres oxydatives plus fortes et de diamètres plus élevés (type IIA) (Baumann *et al.*, 1987; Campos *et al.*, 2002; Hather *et al.*, 1991), tandis que les entraînements d'haltérophilie, qui nécessitent une force élevée pendant une courte durée, induisent une augmentation de la taille et de la force des fibres glycolytiques par remaniement du cytosquelette (Howald, 1982; Luthi *et al.*, 1986). D'autre part, l'absence de stimulation nerveuse -en raison d'une dénervation par exemple- engendre une transformation des fibres lentes en fibres rapides (Talmadge *et al.*, 1995), et, inversement, une stimulation ponctuelle mais répétée du muscle, ainsi que son vieillissement, provoquent une conversion des fibres rapides en fibres lentes.

2 Fonctions du muscle strié squelettique

Le muscle squelettique intervient dans deux fonctions physiologiques essentielles : 1) Il joue un rôle primordial dans le contrôle du métabolisme, permettant en particulier le maintien de l'homéostasie glucidique et constituant une réserve d'acides aminés. 2) Il assure la génération des mouvements, phénomène qui sollicite une de ses propriétés spécifiques : la contractilité musculaire.

2.1 Contrôle du métabolisme

2.1.1 Le muscle squelettique participe au contrôle de l'homéostasie glucidique

Avec le tissu adipeux et le foie, le muscle est le principal organe capable de réguler l'homéostasie glucidique de l'organisme. L'insuline, hormone libérée en situation d'hyperglycémie, déclenche dans les tissus périphériques (tissu adipeux et muscle) une cascade de signalisation complexe dont la réponse finale est la captation et la dégradation du glucose circulant dans le sang. Afin de produire l'ATP nécessaire lors de la contraction musculaire, l'efficacité du transport de glucose est également augmentée dans cette situation, et ce en absence de toute présence d'insuline. Dans les deux cas, qu'il s'agisse d'une stimulation hormonale ou d'un exercice, le transporteur de glucose GLUT4 subit une translocation intracellulaire : les vésicules intracytoplasmiques dans lesquelles il est stocké fusionnent avec la membrane plasmique, exposant ainsi le transporteur au glucose circulant et permettant sa capture dans les cellules (Douen *et al.*, 1990). Le glucose est ensuite phosphorylé pour donner du glucose-6-phosphate. Celui-ci est transformé en ATP directement utilisable, ou stocké sous forme de glycogène.

Lors de l'exercice, la glycogénolyse (dégradation du glycogène en glucose) permet un apport supplémentaire en glucose. Selon l'intensité et la durée du stimulus et le type de fibres musculaires sollicitées, le glucose est (i) soit dégradé partiellement via le processus de glycolyse anaérobie, produisant une accumulation d'acide lactique dans la cellule, (ii) soit oxydé complètement par la voie de la glycolyse aérobie (Gollnick et Matoba, 1984). La dégradation ultérieure de l'ATP produit par ces voies générera non-seulement de l'énergie chimique, mais également un dégagement important de chaleur. Ainsi, en contrôlant l'homéostasie glucidique, le muscle contribue à la régulation de la température corporelle tout en subvenant à ses propres besoins énergétiques.

2.1.2 Le muscle squelettique est un réservoir d'acides aminés

Comme il a été décrit précédemment, le muscle est composé de nombreuses protéines. Chez l'adulte, le maintien de la masse protéique est sous l'influence de deux mécanismes qui sont à l'équilibre dans les conditions physiologiques : la synthèse et la dégradation des protéines. Ces deux composantes du métabolisme protéique -appelées voies anabolique et catabolique- sont sous la dépendance de nombreux facteurs comme l'apport nutritionnel, les stimulations hormonales ou encore l'exercice (Nair et Schwenk, 1994).

Le muscle est assimilable à un réservoir d'acides aminés utilisables lorsque les besoins énergétiques deviennent trop importants. Après ingestion de nourriture, les protéines de l'alimentation sont digérées et les acides aminés issus de cette dégradation et réabsorbés au niveau de la paroi intestinale sont véhiculés par le réseau sanguin jusqu'aux muscles. Ces acides aminés sont utilisés pour la synthèse de protéines afin de maintenir ou même d'augmenter la masse musculaire ou encore de renouveler des protéines endommagées. Lors d'un exercice musculaire intense et soutenu, ou lors d'une situation de jeûne, les protéines musculaires ainsi stockées peuvent être dégradées pour produire de l'énergie.

Dans la cellule musculaire, les acides aminés sont exploités différemment selon les besoins. D'une part, l'activation de la voie mTOR, par stimulation insulino-dépendante de la kinase Akt ou recrutement d'une voie régulée par l'augmentation de la concentration en leucine, induit l'utilisation des acides aminés pour la synthèse protéique (Vary et Lynch, 2007). Il faut souligner qu'au cours des réactions anaboliques, d'autres substrats, tels que le glucose et certains produits issus de sa dégradation comme le pyruvate et le lactate, interviennent dans la synthèse des protéines musculaires (Hedden et Buse, 1982). D'autre part, les acides aminés, en particulier ceux appelés glucoformateurs, sont utilisés pour produire du pyruvate qui est ensuite transformé en glucose-6-phosphate, utilisé pour la synthèse de glycogène. Les protéines constituent ainsi une réserve d'énergie oxydable interne et permettent de stocker des sucres dans le muscle. Enfin, au cours d'une situation de jeûne ou lors de conditions cachexiques, les acides aminés peuvent être mobilisés pour être redistribués aux tissus vitaux (de Blaauw *et al.*, 1999). La glutamine notamment représente le principal acide aminé libéré par le muscle (Wilmore, 2001) et de nombreuses protéines impliquées dans son transport à travers les membranes ont été récemment identifiées (McGivan et Bungard, 2007).

2.2 La contraction musculaire

En plus de sa propriété spécifique -sa capacité à se contracter-, le muscle utilise trois autres propriétés pour réaliser une contraction: l'excitabilité, l'extensibilité et l'élasticité. La contraction musculaire résulte de la mise en jeu de cycles de raccourcissements des myofibrilles qui composent les fibres. Le muscle adaptant sa longueur en fonction des forces externes auxquelles il est soumis, on peut distinguer trois types de contractions. Une contraction est dite **concentrique** lorsque la force interne développée par le muscle est supérieure à la force externe, ce qui entraîne un raccourcissement du muscle qui peut alors déplacer une charge de façon dynamique. Lors d'une contraction **isométrique**, la tension interne et la force externe sont d'intensités égales, ce qui se traduit par une conservation de la longueur du muscle. Ce travail statique est notamment sollicité pour permettre le maintien de la posture. Enfin, lorsque la force exercée sur le muscle est supérieure à la tension musculaire maximale, celle-ci n'est plus capable d'opposer la force externe, ce qui se traduit concrètement par l'allongement du muscle. Ce type de contraction dit **excentrique** est particulièrement utilisé lors de la course en descente. Enfin, il est important de mentionner qu'il existe

une situation particulière, l'**étirement passif**, au cours duquel la génération de tension par le muscle et son étirement se font en l'absence de toute stimulation nerveuse.

On peut distinguer quatre phases au cours de la contraction d'une cellule musculaire: (i) l'excitation (ou stimulation) correspond à l'arrivée du message nerveux sur la fibre musculaire, (ii) le couplage excitation-contraction regroupe l'ensemble des phénomènes biologiques permettant de transformer le signal nerveux en un signal intracellulaire transmis aux myofibrilles, (iii) la contraction proprement dite représente la réponse de la cellule et se traduit par la génération d'une tension, et (iv) la relaxation est la phase de retour à l'état de repos musculaire.

L'évènement déclenchant de la contraction musculaire est l'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison nerveuse d'un neurone moteur. Le neuromédiateur de la contraction musculaire est l'acétylcholine qui est libéré dans la fente synaptique. Après diffusion dans l'espace inter-synaptique, l'acétylcholine se lie aux récepteurs spécifiques localisés sur la membrane musculaire, entraînant sa dépolarisation locale. Le potentiel d'action musculaire ainsi généré va provoquer la naissance d'une vague de dépolarisation propagée tout le long du sarcolemme. Cette propagation génère l'ouverture de canaux sodiques et calciques voltages dépendants, ce qui se traduit par un influx de calcium extracellulaire. Par ailleurs, la vague de dépolarisation est transmise au réticulum sarcoplasmique au niveau des triades. Dans la membrane des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique, le récepteur à la ryanodine (RyR1) forme un canal calcique qui effleure la membrane des tubules transverses. La dépolarisation de la membrane sarcoplasmique et l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium agissent en synergie pour provoquer l'ouverture de RyR1. Le calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique est alors libéré à proximité immédiate des myofibrilles et entraîne, par sa liaison directe, un changement conformationnel de la troponine. Ce changement de structure tridimensionnelle a comme conséquence l'interruption de son interaction avec la tropomyosine, laquelle bloque, à l'état de repos, les sites d'attachements de la myosine sur l'actine. Les têtes de myosine rentrent alors en contact direct avec l'actine, et leurs mouvements sur les filaments fins permettent le glissement relatif des filaments d'actine et de myosine (théorie de Hugh Huxley, 1954) (Huxley, 1969).

Ce phénomène se produisant simultanément pour tous les sarcomères de la cellule, il en résulte une génération de tension qui, en fonction de l'équilibre avec la force externe, peut parfois aboutir à un raccourcissement global de la cellule musculaire selon l'axe longitudinal. Des cycles successifs d'attachements, de mouvements latéraux et de séparations des deux types de filaments se succèdent jusqu'à épuisement des réserves en calcium intrasarcoplasmique. Ces cycles sont également dépendants de l'état énergétique de la cellule, et nécessitent l'enchaînement de phases de liaison et d'hydrolyse de l'ATP par la myosine.

3 Deux propriétés essentielles du tissu musculaire : capacité régénérative et plasticité

Le muscle squelettique est un tissu dynamique qui possède deux propriétés essentielles permettant le maintien de son intégrité et son adaptation à une grande variété de contraintes et de demandes physiologiques. En effet, il est pourvu d'une forte **capacité régénérative** particulièrement utile lors de la croissance musculaire et de la réparation des fibres en cas de lésion. D'autre part, il est capable de réguler positivement et négativement sa masse et il est également le siège de modifications qualitatives, phénomènes attestant de sa **plasticité**.

Ainsi, la structure et les caractéristiques métaboliques et/ou fonctionnelles du muscle squelettique peuvent être modifiées sous l'influence de stimuli affectant l'activité contractile (entraînement en endurance, stimulation électrique, dénervation), de la charge imposée au muscle (entraînement en résistance, microgravité), de l'approvisionnement en substrats (nutrition) ou encore de facteurs environnementaux (tels que l'hypoxie ou le stress thermique). Le muscle squelettique subit également des modifications structurales avec l'âge.

Tous ces événements nécessitent une réponse intégrée, non-seulement de la cytoarchitecture et de la composition de la fibre elle-même, mais aussi des structures qui lui sont associées (notamment le réseau capillaire et les fibres nerveuses). L'ensemble de ces phénomènes est appelé **remodelage**. Ce remaniement nécessite la mise en place précoce d'un processus majeur au sein des noyaux de la fibre musculaire : la reprogrammation transcriptionnelle. La transduction des signaux extracellulaires perçus par la fibre est assurée par un grand nombre de protéines engagées dans différentes voies de signalisation cellulaire qui aboutissent généralement au recrutement ou à l'inactivation de facteurs de transcription.

3.1 La capacité régénérative du muscle squelettique

En cas de lésion, comme une déchirure consécutive à un étirement excessif, ou en association avec certaines pathologies, les fibres musculaires peuvent subir une mort cellulaire non programmée (ou accidentelle) -connue sous le nom de **nécrose**- et dégénérer. Toutefois, ce tissu possède la capacité de « se réparer ». La zone lésée est rapidement envahie par de nombreuses cellules inflammatoires qui éliminent par phagocytose les fibres nécrotiques. Seule la lame basale est conservée et sert de charpente pour la **régénération** (figure 4).

Les cellules satellites sont à l'origine de cette régénération (Mauro, 1961) et représentent un des nombreux acteurs de la plasticité du muscle (pour revue, Anderson, 2006). Majoritairement dans un état quiescent, elles sont activées après lésion musculaire. Leur stimulation serait due à la libération de facteurs de croissance par les cellules inflammatoires, par les fibres lésées (Jacobs *et al.*, 1995), ou encore par la matrice extracellulaire. Ces facteurs d'activation seraient libérés par la déchirure des membranes basales. La morphologie des cellules est alors modifiée et elles prolifèrent sous la forme de myoblastes. Les myoblastes s'alignent puis fusionnent en myotubes multinucléés. Les myotubes deviendront après maturation les fibres musculaires fonctionnelles (figure 4). Lors de la régénération musculaire, les cellules satellites sont donc capables de proliférer sous forme de myoblastes qui fusionnent entre eux pour donner naissance à de nouvelles fibres qui remplaceront les fibres nécrotiques. Soulignons que les cellules satellites peuvent aussi fusionner avec des fibres matures pour les rendre plus solides et plus résistantes lors de sollicitations mécaniques importantes.

Le mécanisme de régénération récapitule la myogénèse embryonnaire. De plus, les processus de régénération du muscle sont associés à un remodelage important du cytosquelette. Ils font notamment intervenir l'expression d'isoformes embryonnaires et néonatales de certaines protéines structurales telles que les chaînes lourdes de myosines (Whalen *et al.*, 1990). Certaines isoformes de l'alpha-actine et de la palladine impliquées dans la conversion de fibroblastes en myofibroblastes semblent participer également aux événements de remodelage (Ronty *et al.*, 2006). De même, l'expression de la γ -actine et de la tropomyosine 4, deux protéines du cytosquelette qui participent à l'assemblage des sarcomères, est stimulée dans des conditions physiologiques et pathologiques faisant intervenir la régénération musculaire (Hanft *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 2004; Vlahovich *et al.*, 2008), suggérant leur implication dans ces mécanismes.

D'autre part, la matrice extracellulaire subit également des remaniements lors de la myogénèse et de la régénération, notamment grâce à la sécrétion de métalloprotéases par les cellules satellites (Guerin et Holland, 1995).

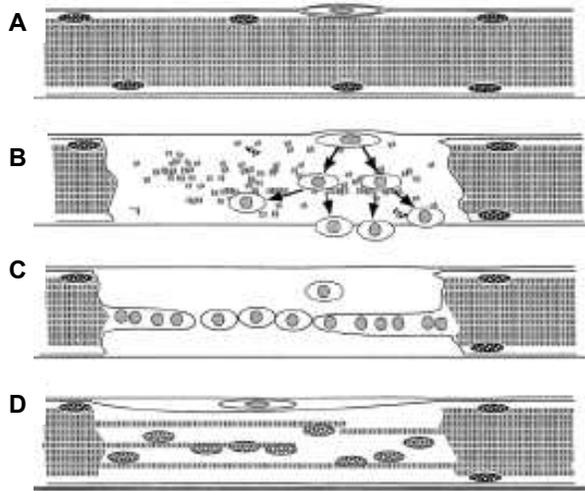


Figure 4 : Schéma de la régénération musculaire

D'après Morgan et Partridge (Morgan and Partridge, 2003). **A/** La fibre normale présente des noyaux en périphérie et une cellule satellite. **B/** Dans la fibre endommagée (nécrotique), la cellule satellite est activée, acquiert les caractéristiques d'un myoblaste et prolifère. **C/** Les myoblastes dérivés de la cellule satellite migrent et fusionnent pour réparer la fibre. **D/** La fibre en cours de régénération présente des noyaux en position centrale caractéristique.

3.2 Les modifications quantitatives du muscle squelettique

3.2.1 *L'hypertrophie musculaire*

Dans un certain nombre de situations physiologiques, le volume et la masse musculaire peuvent augmenter. Ce phénomène peut être la conséquence d'une hypertrophie des fibres elles-mêmes ou d'une augmentation de leur nombre. L'hypertrophie des fibres peut concerner directement les sarcomères ou le sarcoplasme. Une hypertrophie sarcomérique contribue essentiellement à l'augmentation de la force maximale, mais ne participe que faiblement à l'augmentation de la résistance. Cet accroissement de la taille est dû à une synthèse accrue des filaments fins et épais et par conséquent au développement des myofibrilles. De façon opposée, dans les cas d'hypertrophie sarcoplasmique, l'augmentation du volume musculaire n'est pas liée à des modifications des myofilaments, mais plutôt à l'augmentation de la quantité ou du volume des mitochondries (Brzank et Pieper, 1986). Ce type d'hypertrophie ne contribue pas à l'augmentation de la force maximale, mais permet d'améliorer la résistance musculaire.

Lors de l'hyperplasie du muscle strié squelettique un certain nombre de cellules satellites sont activées, entrent en prolifération et fusionnent entre elles pour donner naissance à de nouvelles fibres. Elles s'incorporent à des fibres matures lorsque les conditions favorisent leur hypertrophie (Moss et Leblond, 1971). Il existe actuellement un consensus pour considérer que l'augmentation de la masse musculaire en réponse à l'exercice, notamment lors d'entraînement en force, résulte principalement d'une hypertrophie des fibres musculaires, plutôt que du phénomène d'hyperplasie (McCall *et al.*, 1996). En effet, lorsqu'un muscle est sollicité par un exercice de force supérieure à la normale, l'activation de mécanismes cellulaires permet de stimuler la synthèse protéique, favorisant ainsi le développement des myofilaments. Les voies mises en jeu dans ces processus biologiques seront brièvement détaillées par la suite.

3.2.2 L'atrophie musculaire

L'atrophie musculaire s'observe lors de période d'inactivité prolongée du muscle (à l'occasion d'une immobilisation d'un membre par exemple) (Lindboe et Platou, 1984), lorsque les muscles sont soumis à des conditions d'apesanteur ou encore en absence de stimulation nerveuse (cas de la dénervation). Elle se manifeste aussi au cours du vieillissement (elle est alors appelée « sarcopénie »), ainsi que dans plusieurs pathologies telles que certaines dystrophies musculaires ou dans des maladies où la fonte musculaire est associée à d'autres désordres (dans ce cas, on parle de « cachexie ») : le cancer, le diabète ou lors d'infections sévères (cas du SIDA). Dans les cas pathologiques, l'atrophie musculaire permettrait de limiter les dépenses énergétiques dues à l'activité musculaire et de rediriger les réserves protéiques vers les organes vitaux.

L'atrophie musculaire est sans doute le résultat d'une combinaison de plusieurs mécanismes : une dégradation massive des protéines constituant le muscle associée à une diminution de la synthèse protéique réduisent de façon drastique la quantité totale de protéines (Glass, 2003). De plus, les processus de nécrose et d'apoptose pourraient être à l'origine de l'élimination de fibres musculaires (Sandri, 2002). Enfin, le nombre et la capacité proliférative des cellules satellites diminuant dans la plupart des situations énoncées précédemment (sarcopénie, dénervation, immobilisation, dystrophie musculaire de Duchenne), il semble qu'elles soient incapables de remédier à ces déficiences (Jejurikar et Kuzon, 2003).

De nombreuses études ont permis de démontrer l'implication de plusieurs systèmes protéolytiques dans le processus atrophique. Bien qu'il y ait longtemps eu un consensus suggérant que l'activation des calpaïnes ubiquitaires, protéases dont l'activité est dépendante du calcium, soit principalement responsable d'une première dégradation grossière des protéines constituant les myofibrilles (Bartoli et Richard, 2005), des données plus récentes démontrent que l'activation d'enzymes du lysosome, longtemps considérée comme mineure, pourrait en fait participer pour une large majorité à la dégradation des protéines musculaires (Baar *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007). De fait, l'activité des cathepsines, enzymes lysosomales, est connue pour être augmentée dans de nombreuses conditions atrophiques (Fujita *et al.*, 1996; Voisin *et al.*, 1996). De plus, les caspases, et plus particulièrement la caspase 3, pourraient également participer à l'initiation de la protéolyse (Du *et al.*, 2004) (pour revue lire Ventadour et Attaix, 2006). Les peptides générés par cette première dégradation sont ensuite modifiés par ubiquitination et pris en charge par le système du protéasome 26S qui finalise la dégradation.

3.3 Les modifications qualitatives du muscle squelettique

Si l'exercice physique régule positivement la masse musculaire, l'hypertrophie des fibres n'est pas la seule conséquence. En effet, en fonction du type d'entraînement, un remaniement des fibres et plus précisément de leurs protéines contractiles peut survenir, associé ou non à d'autres modifications musculaires (variation de la biogénèse mitochondriale par exemple) (Fluck, 2003; Fluck et Hoppeler, 2003; Hood, 2001).

Ainsi, un travail d'endurance, qui ne nécessite pas une force importante mais une résistance au cours du temps, va engendrer la modification progressive des fibres glycolytiques IIB en fibres oxydatives IIA. Le volume mitochondrial total peut augmenter jusqu'à 40% et la capillarité musculaire est stimulée. Lors d'un exercice de résistance qui nécessite un effort intense mais de courte durée, le volume myofibrillaire est significativement augmenté (en particulier pour les fibres rapides de type IIA), la densité mitochondriale est

fortement réduite, les cellules satellites sont activées et fusionnent avec les fibres existantes, permettant d'accroître le nombre des noyaux de la fibre en croissance pour maintenir le rapport nucléo-cytoplasmique. De plus, l'architecture musculaire est parfois modifiée, favorisant l'amplitude et la vitesse des contractions (Abe *et al.*, 2000).

Trois facteurs principaux seraient responsables des modifications du typage des fibres. (i) La détection des variations de concentration du calcium intracellulaire, selon une fréquence particulière générée par les cycles excitation-contraction, permet l'expression ciblée de protéines telles que la cytochrome C oxydase (Berchtold *et al.*, 2000; Freyssenet *et al.*, 1999a; Freyssenet *et al.*, 1999b). (ii) Les variations du ratio intracellulaire ATP/AMP activent l'AMPK qui stimule l'expression de gènes métaboliques (Bergeron *et al.*, 2001). (iii) Les variations de la pression partielle d'oxygène intracellulaire pourraient également être associées à des modifications dans la distribution des différents types de fibres (Ishihara *et al.*, 2005; Karlsson, 1985).

3.4 Les voies de signalisation impliquées dans le remodelage

Un grand nombre de protéines et de complexes protéiques interviennent dans la perception et la transmission des signaux induisant le remodelage à l'intérieur de la fibre. L'ensemble des senseurs, messagers et effecteurs impliqués constitue un important réseau d'acteurs de la plasticité dans le muscle squelettique.

Comme la plupart de nos cellules, les cellules musculaires possèdent, sur leurs membranes, des récepteurs pour différentes substances solubles, telles que les hormones et les facteurs de croissance. Après liaison avec leurs ligands, les récepteurs activent des cascades cellulaires permettant de transmettre l'information à l'intérieur de la cellule, notamment au niveau du noyau où la réponse va être initiée par l'intermédiaire d'une reprogrammation transcriptionnelle. D'autre part, la fibre musculaire adapte aussi son état physiologique aux signaux mécaniques qu'elle est capable de percevoir.

Les multiples acteurs de la plasticité participent à des voies de signalisation cellulaire relativement bien décryptées. La réponse finale de la fibre dépend du stimulus de départ et est le plus souvent le résultat de l'activation simultanée de plusieurs voies et de l'inhibition d'autres voies. Il existe notamment un équilibre entre les voies de synthèse des protéines et les voies impliquées dans leur dégradation. Les voies impliquées étant nombreuses, cet exposé sera limité aux mécanismes d'intérêt pour cette thèse.

3.4.1 Les voies de signalisation contrôlant la masse musculaire

De nombreux progrès ont été faits récemment dans l'identification des voies de signalisation régulant la masse musculaire. En présence d'un signal hypertrophique comme celui initié par l'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), la Protéine Kinase B (PKB, aussi connue sous le nom d'Akt) est recrutée à la membrane par association avec les phosphoinositides synthétisés par la Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K). Akt est alors activé par phosphorylation par la Phospholipid Dependent Protein Kinase 1 (PDK1) et phosphoryle à son tour une variété des substrats impliqués dans la transcription génique, la synthèse protéique et la prolifération cellulaire (Bodine *et al.*, 2001b). On peut distinguer, en aval d'Akt, au moins deux voies impliquées dans la stimulation de l'hypertrophie. (i) Akt active mTOR par phosphorylation, entraînant une stimulation de la kinase p70S6, un régulateur positif de la traduction (von Manteuffel *et al.*, 1996) et une inhibition de l'activité de PHAS-1 (appelé aussi 4E-BP1), un régulateur négatif du facteur d'initiation eIF-4E

(Hara *et al.*, 1997). (ii) Akt peut également phosphoryler la Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β) qui est alors inactivée, levant l'inhibition du facteur d'initiation eIF-2B (Hardt et Sadoshima, 2002) (figure 5).

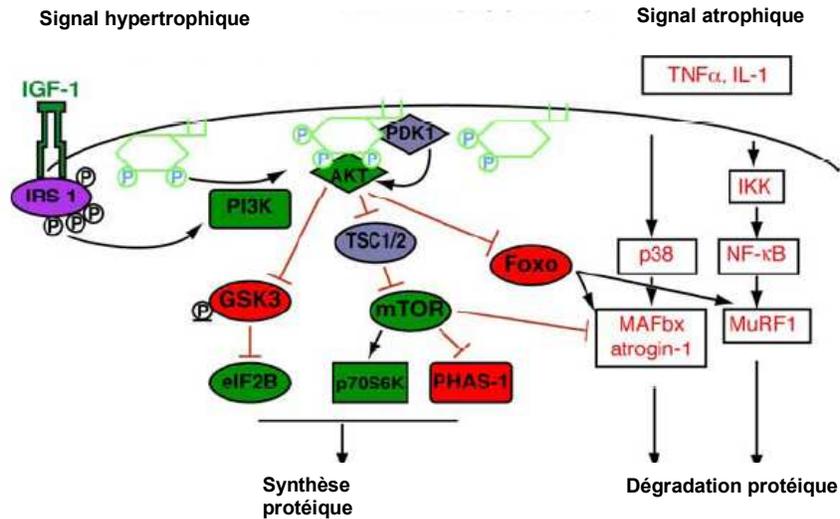


Figure 5: Représentation schématique des principales voies de signalisation régulant l'hypertrophie et l'atrophie du muscle squelettique.

D'après Glass *et al.* (Glass, 2005)

Plusieurs cytokines sont décrites pour engendrer les processus atrophiques. Tumor Necrosis Factor α (TNF α), en particulier, est une cytokine pro-inflammatoire dont le taux sanguin est très élevé chez les patients atteints de cancer. Sa liaison avec son récepteur induit l'activation des facteurs de transcription de la famille Rel/NF- κ B (von Haehling *et al.*, 2002). Cette activation est le résultat de l'ubiquitination et de la dégradation de son répresseur I κ B après phosphorylation par IKK (Yaron *et al.*, 1998). Par ailleurs, la voie NF- κ B est également activée lors des processus atrophiques déclenchés par l'inactivité musculaire (Hunter *et al.*, 2002) ou la septicémie (Penner *et al.*, 2001). D'autre part, la phosphorylation de la Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) p38 participe également au processus atrophique après stimulation par le TNF α ou l'InterLeukine 1 (IL1) (Puigserver *et al.*, 2001).

L'atrophie musculaire est essentiellement due à une stimulation de la dégradation protéique reconnue pour être due, au moins en partie, à l'activité (dépendante de l'ATP) du système ubiquitine-protéasome 26S (Jagoe et Goldberg, 2001). L'addition d'ubiquitine aux protéines est un processus qui permet de cibler les substrats destinés à être dégradés par le protéasome (Wing, 2005). Ce processus fait intervenir trois complexes enzymatiques distincts : les « ubiquitin-activating » enzymes E1, les « ubiquitin-conjugating » enzymes E2 et les « ubiquitin-ligating » enzymes E3 (Figure 6A). Les ubiquitine-ligases E3 sont responsables de la spécificité de substrat. Elles sont habituellement classées en deux catégories en fonction du domaine impliqué dans le transfert de l'ubiquitine sur leur substrat : elles comportent soit un domaine HECT, soit un domaine RING. Toutefois, en ce qui concerne le domaine RING, il peut être porté par une protéine assurant sa fonction d'E3 comme un monomère ou par une des sous-unités d'un complexe multi-protéique où chaque composant est nécessaire pour l'activité ubiquitine-ligase (figure 6B) (pour revue voir Lecker, 2003). Les protéines de la famille culline sont à l'origine de la structure de base pour l'assemblage de ce type d'E3 (pour revue voir Petroski et Deshaies, 2005). Dans les complexes faisant intervenir Cul3 -

appelés complexes BCR3 (BTB-domain/Cul3/RING)-, la spécificité de substrat est assurée par une protéine comportant un domaine BTB (Bric-a-brac, Tramtrack, et Broad) qui permet le rapprochement de la culline et du substrat (pour revue voir Pintard *et al.*, 2004).

Deux ubiquitine-ligases E3, MuRF-1 (ou TRIM63) et MAFbx (appelée aussi Atrogin-1), sont abondamment décrites pour intervenir dans l'atrophie musculaire (Bodine *et al.*, 2001a). Leur expression est fortement stimulée dans les conditions de dénervation et d'immobilisation, ainsi que dans les muscles de multiples modèles d'atrophie musculaire (Clavel *et al.*, 2006; Dehoux *et al.*, 2004; Dehoux *et al.*, 2003; Di Giovanni *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2004; Krawiec *et al.*, 2005; Latres *et al.*, 2005; Lecker *et al.*, 2004; Leger *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2003; Sacheck *et al.*, 2007; Wray *et al.*, 2003) (pour revue Glass, 2005). MuRF-1, qui contient un domaine RING-finger nécessaire à son activité ubiquitine-ligase, est responsable notamment de l'ubiquitination de la troponine I (Kedar *et al.*, 2004) et semble participer à la régulation du turnover de la titine (McElhinny *et al.*, 2002). MAFbx comprend un domaine F-box caractéristique des membres de la famille de E3 connue sous le terme de SCF (pour Skp1, Cullin, F-box). Elle intervient dans la dégradation de la calcineurine (Li *et al.*, 2004) et de MyoD (Tintignac *et al.*, 2005). On pense classiquement que la voie NF- κ B entraîne exclusivement la stimulation de MuRF-1 (Cai *et al.*, 2004), bien qu'il ait été récemment suggéré qu'elle pourrait aussi avoir une action sur MAFbx (Judge *et al.*, 2007). Quant à la stimulation de MAFbx, elle résulte surtout de la voie p38 (Li *et al.*, 2005) (figure 5). A ce jour, aucun élément ne permet de savoir si cette voie n'agirait pas aussi sur MuRF-1. Par ailleurs, la stimulation d'un troisième type d'ubiquitine-ligase E3 -E3 α - a été rapportée dans de nombreuses conditions atrophiques liées à la septicémie (Fischer *et al.*, 2000), au diabète (Lecker *et al.*, 1999) ou à la diète (Kwon *et al.*, 2001) (figure 6B).

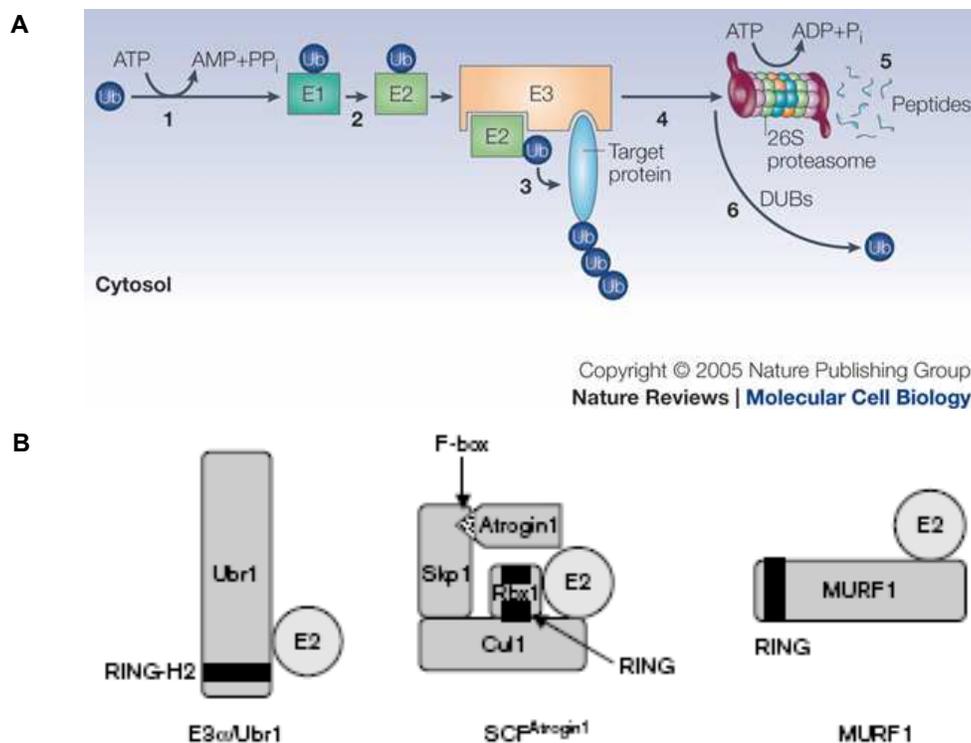


Figure 6 : Dégradation des protéines par la voie du protéasome

A/ représentation schématique de la voie du protéasome. E1: Ubiquitin-activating enzyme E2: Ubiquitin-conjugating enzyme E3: Ubiquitin-protein ligase DUB: Deubiquitinating enzyme **B/** Les différentes ubiquitine-ligases E3 comprenant un domaine « RING » et impliquées dans l'atrophie. D'après Lecker *et al.* (Lecker, 2003)

Bien que l'hypertrophie soit principalement due à une augmentation de la synthèse protéique, elle est aussi associée à une inhibition des voies atrophiques. Il a d'ailleurs été démontré récemment qu'Akt peut inhiber l'expression des protéines MuRF-1 et MAFbx, en inhibant par phosphorylation la translocation nucléaire des facteurs de transcription de la famille Forkhead box-containing protein O (FoxO) (Lee *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2004). Les voies de synthèse et de dégradation des protéines semblent donc étroitement liées (figure 5).

3.4.2 Les voies stimulées par l'exercice

Lorsque le muscle est soumis à un exercice, la concentration intracellulaire en calcium s'élève. Ce flux calcique devient alors un signal précoce qui active des messagers secondaires à l'origine de différentes voies. Le calcium permet notamment la régulation de plusieurs kinases et phosphatases, induisant de cette manière des modifications post-traductionnelles de divers facteurs de transcription et/ou leur translocation, permettant la liaison de certains de ces facteurs avec leurs éléments régulateurs. Cela aboutit généralement à une activation de gènes cibles.

Les principales voies stimulées par le calcium sont celles de la calcineurine-NFAT, des kinases dépendantes en calcium/calmoduline (CaMK) (Rose *et al.*, 2006) et de la Protéine Kinase C (PKC) (Rose *et al.*, 2004). Ces voies activent des facteurs de transcription qui régulent des activités physiologiques essentielles, telles que l'expression de gènes nucléaires et mitochondriaux impliqués dans la biogénèse mitochondriale (Wu *et al.*, 2002), l'expression de gènes impliqués dans le transport du glucose (Holmes et Dohm, 2004; Richter *et al.*, 2001), la régulation de l'expression et de l'activité d'enzymes oxydatives (Ojuka, 2004), l'expression de protéines spécifiques d'un type de fibres. La voie calcineurine est notamment responsable de l'expression des gènes des fibres lentes (Chin *et al.*, 1998; Naya *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000) et est impliquée également dans l'hypertrophie des fibres (Dunn *et al.*, 1999) (figure 7).

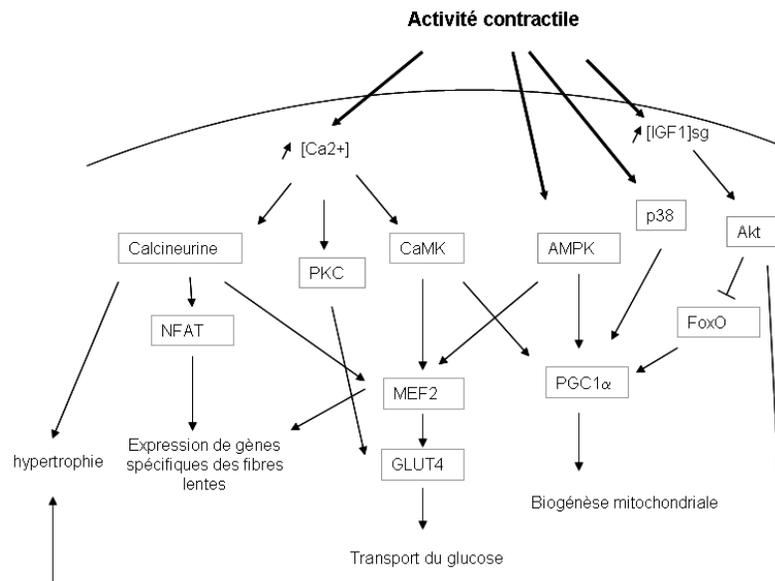


Figure 7: Représentation schématique des principales voies de signalisation activées dans le muscle en réponse à l'exercice

Lors de l'activité contractile, d'autres kinases indépendantes du calcium sont impliquées dans la phosphorylation de facteurs de transcription. Les kinases principales sont l'AMPK, Akt/PKB et les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK) ERK1/2 et p38 (figure 7). La protéine PGC-1 α (Peroxysome-proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 α), connue pour stimuler la biogénèse mitochondriale, est une cible commune à ces 3 voies. D'une part, l'activation de p38 participe à l'activité contractile grâce à la stimulation de PGC-1 α par des phénomènes qui allieraient une action directe sur son activité (Wright *et al.*, 2007) et une augmentation plus tardive de son expression (Akimoto *et al.*, 2005). D'autre part, l'AMPK active également PGC-1 α et cette activation aboutit en outre à une augmentation de son expression (Jager *et al.*, 2007). Enfin, la phosphorylation Akt-dépendante du facteur de transcription FoxO entraînerait son exclusion du noyau et la réduction de l'expression de PGC-1 α (Daitoku *et al.*, 2003).

4 Pathologies musculaires

Les pathologies dues à une anomalie des fibres musculaires sont regroupées sous le terme de **myopathies** et sont caractérisées par une déstabilisation et une dégénérescence musculaires conduisant le plus souvent à une altération et à une perte des fonctions locomotrices. Elles se répartissent en deux grands groupes : les myopathies d'origine génétique et les myopathies acquises.

Plus de 80 myopathies d'origine héréditaire ont été identifiées. Elles peuvent être classées en plusieurs catégories en fonction de l'atteinte musculaire : les dystrophies musculaires progressives, les dystrophies musculaires congénitales, les myopathies distales, les myopathies à excès de filaments, les myopathies congénitales, les syndromes myotoniques, les paralysies périodiques et les myopathies métaboliques. Parmi ces pathologies, le groupe plus complexe est celui des dystrophies musculaires qui comprend au moins 25 pathologies différentes dont les **dystrophies des ceintures** (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophy).

4.1 Les dystrophies des ceintures

Génétiquement et cliniquement hétérogènes, les dystrophies des ceintures sont caractérisées par une atrophie et une faiblesse progressive des muscles proximaux des ceintures pelvienne et scapulaire et une élévation du taux sérique de créatine kinase. Sur le plan histologique, des profils de nécrose régénération avec centronucléation et infiltrations macrophagiques, caractéristiques de la dégénérescence musculaire, sont observables (Fardeau *et al.*, 1996). Les dystrophies des ceintures peuvent être classées en fonction de leur mode de transmission : les LGMD1 et LGMD2 désignent les formes dominantes et récessives respectivement (Bushby et Beckmann, 1995). A ce jour, au moins 20 formes ont été individualisées et sont distinguées par l'addition d'une lettre capitale (LGMD1A à 1G et LGMD2A à 2M) (Danièle *et al.*, 2007). Un grand nombre de gènes responsables de ces dystrophies ont été identifiés. Les protéines correspondantes appartiennent à différents groupes en fonction de leur localisation subcellulaire (noyau, cytoplasme, cytosquelette et sarcolemme) et de leur fonction (structurale ou enzymatique).

Les formes dominantes montrent habituellement une sévérité modérée et sont souvent associées à d'autres signes cliniques tels que des anomalies du muscle cardiaque. Pour trois des sept formes dominantes répertoriées, les gènes et protéines responsables ont été identifiés. La LGMD1A est due à des défauts dans le gène de la myotiline qui est une protéine de structure de la bande I du sarcomère (Hauser *et al.*, 2000). La LGMD1B est due à des défauts dans le gène de la lamine A/C (Muchir *et al.*, 2000), filaments intermédiaires de la membrane nucléaire. La LGMD1C est due à des défauts dans le gène de la cavéoline 3

(Minetti *et al.*, 1998); des mutations dans ce gène ont été aussi associées à une transmission récessive (McNally *et al.*, 1998). La calpaïne 3 est, dans le muscle strié, la protéine principale de constitution des caveolae, invaginations de la membrane plasmique participant au trafic vésiculaire et à la transduction du signal (Schlegel et Lisanti, 2001).

Le groupe des formes récessives est encore plus complexe que celui des formes dominantes. Des mutations dans le gène de la calpaïne 3, une protéase spécifique du muscle dont l'activité est dépendante du calcium (Garcia Diaz *et al.*, 2006), sont à l'origine de la LGMD2A (Richard *et al.*, 1995) qui est la forme la plus répandue (elle représente 30 à 40 % des dystrophies des ceintures) et sur laquelle nous portons une attention particulière dans le laboratoire. Le gène responsable de cette forme de dystrophie a été localisé dans l'intervalle 15q15.1-q15.3, à partir d'études de liaison réalisées sur des familles réunionnaises (Allamand *et al.*, 1995; Beckmann *et al.*, 1991). À ce jour, plus de 280 mutations, réparties sur l'ensemble de la séquence du gène de la calpaïne 3, ont été identifiées parmi lesquelles des mutations non-sens qui conduisent à une atteinte plus sévère (Duguez *et al.*, 2006; Richard *et al.*, 1999).

Des mutations récessives dans le gène de la titine, une protéine géante responsable de l'organisation et l'élasticité du sarcomère, engendrent une LGMD2J avec, de façon intéressante, une déficience secondaire en calpaïne 3 (Hackman *et al.*, 2002; Haravuori *et al.*, 2001). Notons également (i) que des mutations dominantes de ce même gène donnent lieu à une Dystrophie Musculaire Tibiale (TMD) (Udd *et al.*, 2005), (ii) qu'une délétion dans la partie C-terminale du gène peut aussi provoquer des anomalies cardiaques observées lors de la cardiomyopathie dilatée (DCM) (Carmignac *et al.*, 2007), et (iii) qu'une mutation spécifique de la titine dans la bande N2A conduit à une dystrophie musculaire dite myositis (MDM) chez la souris (Garvey *et al.*, 2002) (pour revue Granzier et Labeit, 2004). Une autre forme de LGMD liée à la déficience d'une protéine participant à la structure du sarcomère a été identifiée : la LGMD2G qui est due à des mutations dans le gène de la téléthonine, une protéine du muscle strié et cardiaque localisée dans la bande Z du sarcomère (Moreira *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2000).

De nombreux autres gènes impliqués dans les formes récessives des dystrophies des ceintures ont été identifiés (Pour revue, lire Danièle *et al.*, 2007). Le gène responsable de la LGMD2B a été identifié comme le gène de la dysferline, une protéine impliquée dans la réparation membranaire (Bansal *et al.*, 2003; Bashir *et al.*, 1998). Dans ce cas également, une réduction secondaire de l'expression de la calpaïne 3 a été observée (Anderson *et al.*, 2000). La déstabilisation de l'interaction récemment identifiée entre la calpaïne 3 et la dysferline (Huang *et al.*, 2005) pourrait permettre d'expliquer cette réduction. Des mutations dans le gène de la dysferline peuvent conduire à un autre phénotype: la myopathie distale de Miyoshi (Liu *et al.*, 1998; Weiler *et al.*, 1999).

Les sarcoglycanopathies -sous-groupe composé des formes LGMD2C, 2D, 2E et 2F- sont dues à des mutations dans les gènes codant la γ - (Noguchi *et al.*, 1995), l' α - (Roberds *et al.*, 1994), la β - (Bonnemann *et al.*, 1995; Lim *et al.*, 1995) et la δ -sarcoglycane (Nigro *et al.*, 1996) et sont caractérisées par une dissociation du complexe des sarcoglycanes, complexe associé à la dystrophine au niveau de la membrane des cellules musculaires. Des mutations dans les gènes codant des protéines participant aux modifications post-traductionnelles de l' α -dystroglycane -fukutine, FuKutin Related Protein (FKRP), et Protein O-Mannosyl Transferase 1 et 2 (POMT1 et 2)- sont responsables des LGMD2L, 2I et 2K respectivement (Brockington *et al.*, 2001; Esapa *et al.*, 2002; Godfrey *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). Quant à la LGMD2H, elle est due à des mutations dans « Tripartite-motif-containing protein 32 » (Trim 32), une ubiquitine-ligase E3 (Frosk *et al.*, 2002). Enfin, récemment, une nouvelle mutation a été décrite dans un gène situé sur le chromosome 11 ;

elle serait responsable d'une dystrophie atteignant initialement le muscle quadriceps avant d'évoluer en LGMD (LGMD2M) (Jarry *et al.*, 2007).

Si les mécanismes physiopathologiques conduisant aux sarcoglycanopathies sont relativement bien décrits, ceux des LGMD2A et 2J, en revanche, ne sont pas encore clairement démontrés. Ils pourraient être dus à une altération de la structure du muscle, mais également à un défaut de sa plasticité. Le rôle de la titine dans les mécanismes de remodelage semble en accord avec cette hypothèse. En revanche, la fonction physiologique de la calpaïne 3 n'étant pas clairement établie, son étude représente un des objectifs du laboratoire.

4.2 La titine : une protéine clé du muscle squelettique

La titine (appelée également connectine) est une protéine géante codée par un gène d'une taille approximative de 294 kb situé sur le chromosome 2 et composé de 363 exons. Exprimée dans une variété de tissus, elle est particulièrement abondante dans les muscles squelettiques et cardiaques sous formes de diverses isoformes issues d'un épissage alternatif (Bang *et al.*, 2001a; Gautel *et al.*, 1996; Kolmerer *et al.*, 1996; Labeit et Kolmerer, 1995; Labeit *et al.*, 2006).

Protéine essentielle pour l'organisation et l'intégrité des sarcomères, elle constitue le troisième réseau de filaments après ceux de l'actine et de la myosine et représente le seul système continu sur toute la longueur des sarcomères. Sa structure singulière composée de nombreuses répétitions Ig et FNIII et de domaines uniques particuliers font de cette molécule, une protéine clé du muscle squelettique impliquée dans des processus mécaniques, ainsi que dans des mécanismes de développement et de régulation. En effet, en plus de son rôle structural et de son implication dans la contraction et l'élasticité du muscle, la titine semble jouer un rôle prépondérant dans la perception et la transduction de signaux. A l'aide de ses nombreux partenaires présents tout au long de sa séquence, elle permet de véhiculer les messages jusqu'aux cibles effectrices de la réponse (Granzier et Labeit, 2004).

4.2.1 *La titine dans la bande I*

Dans la bande I, la titine présente une structure originale responsable de l'élasticité des fibres. Elle comprend des répétitions Ig en tandem, une région unique N2A comportant également des domaines de type Ig et un domaine **PEVK** (riche en proline (**P**), glutamate (**E**), valine (**V**) et lysine (**K**)) (Labeit et Kolmerer, 1995). En condition d'étirement léger, les modules Ig s'allongent séquentiellement. En condition d'étirement plus important, le segment PEVK est à son tour recruté et s'étend tel un ressort (Linke *et al.*, 1998). Finalement, lorsque l'étirement du muscle cesse, la structure reprend sa conformation initiale, d'où sa qualification de région « élastique ». De plus, la région PEVK est responsable de l'interaction de la titine avec la nébuline et l'actine (Gutierrez-Cruz *et al.*, 2001; Kulke *et al.*, 2001). D'autres partenaires (calpaïne 3 et protéines MARP) ont été identifiés au niveau de la bande I de la titine (Miller *et al.*, 2003) et feront l'objet d'une description plus détaillée par la suite.

4.2.2 *La titine dans le disque Z*

Au niveau de son extrémité N-terminale qui couvre l'ensemble du disque Z, la titine se lie à la **téléthonine** (Gregorio *et al.*, 1998; Mues *et al.*, 1998), protéine appelée également Tcap pour son rôle de coiffe de la titine. Celle-ci est capable d'interagir avec la myostatine (Nicholas *et al.*, 2002) et avec des

protéines de la famille **FATZ** qui sont dénommées ainsi en raison de leur faculté à lier la **Filamine**, l' α -**Actinine** et la **Téléthonine** du disque **Z** (Faulkner *et al.*, 2000). Cette famille est responsable de l'ancrage de la **calcineurine** dans le disque Z et semble d'ailleurs participer à la régulation de son activité (Frey *et al.*, 2000). De façon intéressante, la voie de la calcineurine joue un rôle majeur dans l'hypertrophie musculaire. En effet, elle active par déphosphorylation **NF-AT3**, un facteur de transcription associé à la ligne Z, entraînant ainsi sa translocation vers le compartiment nucléaire où il va stimuler la synthèse de protéines musculaires. De plus, en régulant également le facteur MEF2, la calcineurine active l'expression des gènes spécifiques aux fibres lentes (Olson et Williams, 2000).

La **filamine** quant à elle, possède aussi de nombreux autres partenaires tels que la **myotiline** (van der Ven *et al.*, 2000) et les δ - et γ -sarcoglycanes (Thompson *et al.*, 2000). Il a été montré récemment que la myotiline pourrait jouer un rôle dans l'assemblage de nouveaux sarcomères en cas de lésion des myofibrilles et constituerait un marqueur du remodelage musculaire (Carlsson *et al.*, 2007). La filamine se lie en outre à SHIP-2, une phosphatase impliquée dans la régulation de la voie insuline (Dyson *et al.*, 2001).

Comme précédemment évoqué, la titine interagit avec l' α -**actinine**, un acteur majeur de l'organisation structurale du disque Z. De nombreuses protéines lui sont associées, en particulier des protéines présentant la particularité de pouvoir se relocaliser dans d'autres compartiments cellulaires et participant ainsi à la signalisation cellulaire. C'est le cas notamment des **Muscle Lim Proteins (MLP)** dont le passage nucléaire est induit par des signaux d'hypertrophie (Ecarnot-Laubriet *et al.*, 2000). La titine et ses nombreux partenaires (figure 8) font donc du disque Z un acteur central de la transduction de signaux ainsi que du contrôle de l'intégrité des myofibrilles lors de sollicitations mécaniques.

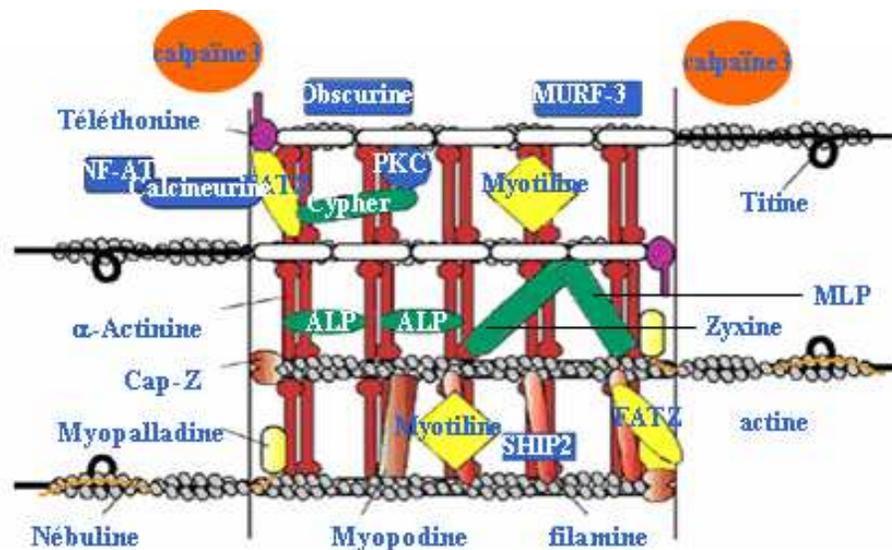


Figure 8 : Dans la région du disque Z, la titine possède de nombreux partenaires potentiellement impliqués dans la transduction de signaux

4.2.3 La titine dans la ligne M

La région C-terminale de la titine se situe au niveau de la ligne M du sarcomère. Elle comprend un site potentiel de **phosphorylation** et un domaine actif de type sérine/thréonine **kinase** (Labeit et Kolmerer, 1995) dont plusieurs substrats sont déjà identifiés. La titine-kinase serait notamment responsable de la phosphorylation de la **myosine** nécessaire à la régulation de la contraction musculaire, ainsi que de la téléthonine (Mayans *et al.*, 1998). De plus, son activité pourrait être régulée par **MuRF-1**, protéine qui se fixe aux domaines Ig à proximité du domaine kinase (McElhinny *et al.*, 2002), mais dont le transport vers le compartiment nucléaire serait à l'origine de cascades cellulaires impliquées dans l'atrophie (Bodine *et al.*, 2001a; Centner *et al.*, 2001). Cette ubiquitine-ligase E3 est notamment impliquée dans la dégradation de la titine, la nébuline, la téléthonine et la tropomyosine (Witt *et al.*, 2005) et joue un rôle dans la régulation de l'expression génique ainsi que de l'activité contractile (Kedar *et al.*, 2004). Un autre membre de la famille des protéines MuRF -MuRF2- ferait partie d'une voie de signalisation initiée par le domaine kinase de la titine et qui serait impliquée dans la régulation de l'expression génique (Lange *et al.*, 2005b). D'ailleurs une mutation dominante dans la séquence Mex1 codant le domaine kinase abolie cette voie et est responsable d'une myopathie sévère -Hereditary Myopathy with Early Respiratory Failure (HMERF)- caractérisée par une atteinte des muscles squelettiques aussi bien que des muscles respiratoires.

Dans la ligne M, la titine interagit également avec FHL2 (Four and Half Lim protein 2), une protéine adaptatrice qui constitue un lien entre la titine et différentes enzymes métaboliques (créatine kinase, phosphofructokinase, adénylate kinase) (Lange *et al.*, 2002). Dans cette région, elle se lie en outre à la calpaïne 3 (Kinbara *et al.*, 1997), une protéase dont la fonction est imprécise et de façon indirecte à la protéine KY qui est essentielle pour la croissance normale du muscle et la stabilisation de la jonction neuromusculaire (Beatham *et al.*, 2006; Blanco *et al.*, 2001). L'obscurine, impliquée dans l'assemblage des sarcomères, interagit également avec la titine au niveau de la ligne M ainsi que du disque Z (Young *et al.*, 2001). La ligne M, grâce aux domaines spécifiques de la titine et aux protéines qui lui sont associées (figure 9), contribuerait ainsi, elle aussi, à la transduction des signaux mécaniques de remodelage perçus par la fibre.

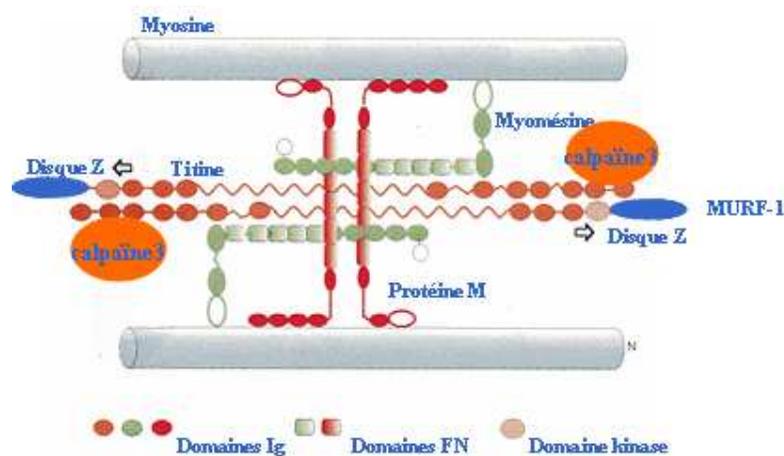


Figure 9 : Dans la bande M, la titine possède des domaines et des partenaires potentiellement impliqués dans la transduction de signaux

4.3 La calpaïne 3 : une protéase dont la fonction reste imprécise

4.3.1 *Caractéristiques structurales et biochimiques de la calpaïne 3*

La calpaïne 3 (également appelée p94) appartient à la famille des calpaïnes qui sont toutes des protéases à cystéines (Dear *et al.*, 1999). Cette famille comprend entre-autres deux protéines ubiquitaires : les calpaïnes 1 et 2 (ou μ - et m-calpaïnes). La calpaïne 3 a longtemps été décrite comme une isoforme spécifique du muscle squelettique (Sorimachi *et al.*, 1989). Toutefois, il a été montré qu'elle pouvait être exprimée dans le muscle cardiaque au cours de l'embryogénèse (Fougerousse *et al.*, 1998). De même, différentes isoformes résultant d'un épissage alternatif ont été identifiées dans le cristallin (Ma *et al.*, 1998) et le cerveau de rats (Konig *et al.*, 2003).

Bien que les fonctions physiologiques des calpaïnes restent encore imprécises, ces protéases ont été impliquées dans une variété de processus incluant l'apoptose (Baghdiguian *et al.*, 1999; Chua *et al.*, 2000; Sorimachi *et al.*, 1997b), la différenciation myogénique (Kramerova *et al.*, 2006; Kwak *et al.*, 1993; Moraczewski *et al.*, 1996; Moyon *et al.*, 2004; Stockholm *et al.*, 1999), la division et la fusion cellulaire (Barnoy *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2004; Santella *et al.*, 1998; Schollmeyer, 1988), la régulation de l'expression génique (Hirai *et al.*, 1991), et bien d'autres encore.

La calpaïne 3, de poids moléculaire 94 kDa, est codée par un gène constitué de 24 exons répartis sur une région de 35 kb du chromosome 15. La protéine comporte 821 acides aminés et est composée de quatre domaines retrouvés chez les membres de la famille des calpaïnes (figure 10): (i) le domaine I ne présente aucune homologie avec des séquences connues. Sa fonction n'est pas encore clairement définie ; (ii) le domaine II présente de fortes homologies avec les autres protéases à cystéines. Constitué de deux régions globulaires, qui comportent la cystéine (Cys), l'histidine (His) et l'asparagine (Asn) de la triade catalytique, il forme le sillon catalytique nécessaire à l'activité protéolytique ; (iii) le domaine III, de type C2, est impliqué dans des interactions protéines-protéines. Ce domaine possède également une boucle EF-Hand capable de lier le calcium. Il pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité de la calpaïne 3 ; et (iv) le domaine IV comprend cinq séquences de type EF-Hand.

La calpaïne 3 se différencie des autres calpaïnes par l'existence de trois régions qui lui sont strictement spécifiques (figure 10) (Sorimachi *et al.*, 1989): en N terminal, se trouve le domaine NS (Séquence N terminale) dont la fonction est inconnue; dans le domaine II, se trouve le domaine IS1 (Séquence d'Insertion 1) qui comprend les sites d'autolyse de la calpaïne 3 ; enfin, à la jonction des domaines III et IV, se trouve le domaine IS2 (Séquence d'Insertion 2) qui permet la liaison à la titine et qui comporte un signal de localisation nucléaire (NLS).

Les premières caractérisations biochimiques de la calpaïne 3 ont montré que cette enzyme s'autolysait sous la forme de deux fragments principaux (Sorimachi *et al.*, 1993). Cette autolyse, qui a lieu dans le domaine IS1, constitue le mécanisme d'activation de la protéase et est décrite comme séquentielle (Taveau *et al.*, 2003). Ainsi trois sites d'autolyse (S1, S2 et S3) ont été mis en évidence dans IS1, conduisant à la formation d'un fragment court de 34 kDa et de fragments plus longs compris entre 55 et 60 kDa (Kinbara *et al.*, 1998). Lorsque la protéine est entière, une hélice α codée par la séquence IS1, ferme le sillon catalytique, empêchant les substrats et les inhibiteurs d'y pénétrer (Diaz *et al.*, 2004). Lorsque celle-ci s'autolyse, elle libère le fragment IS1 (coupure intramoléculaire) qui libère alors le sillon catalytique. La

protéine devenue active peut alors cliver ses substrats mais également d'autres molécules de calpaïne 3 (coupure intermoléculaire).

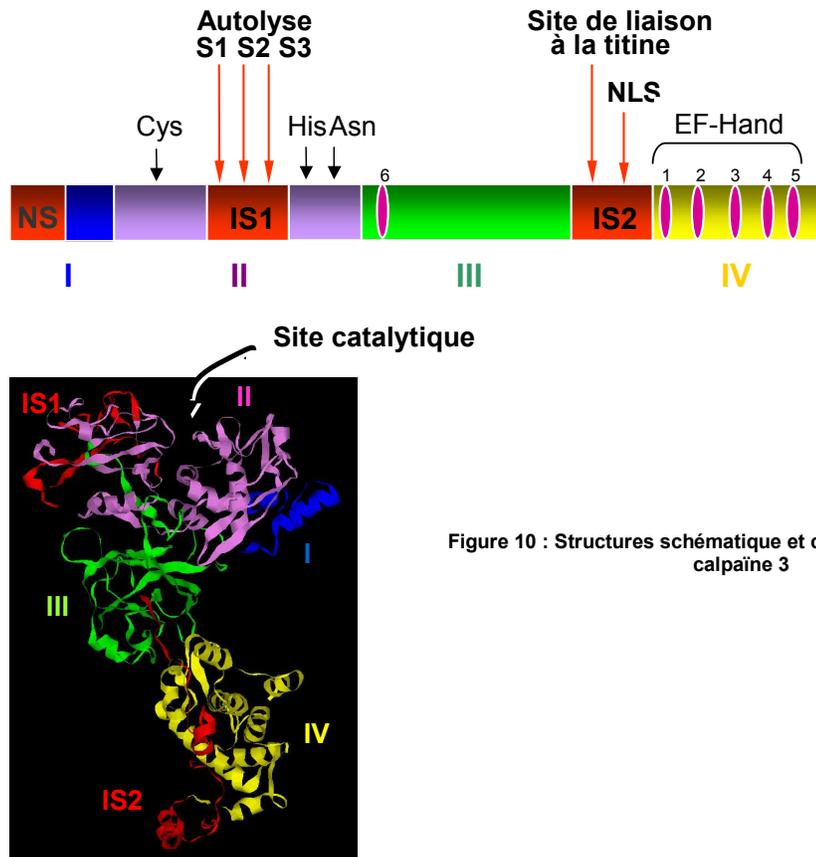


Figure 10 : Structures schématique et cristallographique de la calpaïne 3

Dans le muscle, la calpaïne 3 est majoritairement présente sous forme non-autolysée (94kDa) (Kinbara *et al.*, 1998; Sorimachi *et al.*, 1990) suggérant qu'elle s'y trouve principalement sous une forme inactive. Au contraire, lorsqu'elle est exprimée de manière ectopique dans un système non musculaire, elle s'active spontanément et est retrouvée sous forme autolysée (Taveau *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent qu'il existe un inhibiteur de la calpaïne 3, spécifique au muscle, capable de maintenir la protéase sous forme inactive. Une protéine fortement candidate pour jouer ce rôle est la titine. En effet, elle interagit avec la calpaïne 3 et elle possède des régions homologues à la calpastatine, l'inhibiteur endogène des calpaïnes ubiquitaires.

4.3.2 Localisation et fonction de la calpaïne 3

La fonction précise de la calpaïne 3 dans le muscle squelettique n'est pas connue, mais son absence ou son inactivité étant responsable de la LGMD2A, il semblerait qu'elle soit nécessaire à l'intégrité du tissu musculaire. Localisée en différents points du sarcomère (Kinbara *et al.*, 1997; Sorimachi *et al.*, 1995; Taveau *et al.*, 2003), la protéase a également été mise en évidence dans le compartiment nucléaire de cellules en culture (Sorimachi *et al.*, 1993) et de muscle humain (Baghdigian *et al.*, 1999), suggérant qu'elle pourrait participer à des voies de signalisation. D'autre part, elle a également été observée au niveau des

costamères et dans les jonctions myotendineuses (Taveau *et al.*, 2003), des sites impliqués dans la transmission de la force.

Des expériences d'expression ectopique de la calpaïne 3 dans différents types cellulaires non musculaires, ont permis de mettre en évidence une altération du cytosquelette cellulaire, conduisant à une perte de la morphologie et de l'adhésion cellulaire (Taveau *et al.*, 2003). Dans ce contexte, plusieurs substrats de la calpaïne 3 ont pu être identifiés tels que la taline, la vinexine α et l'ezrine, qui sont des protéines des adhésions focales, ainsi que les filamines A et C et la titine, qui sont des protéines du cytosquelette musculaire. Plus récemment une diminution de l'expression de la protéine Myosin Light Chain 1 (MLC1) a été observée *in vitro* en présence de calpaïne 3 ainsi que dans les muscles des souris transgéniques surexprimant cette protéase, suggérant que MLC1 soit aussi un substrat de la calpaïne 3 (Cohen *et al.*, 2006). Il semble donc que la calpaïne 3 puisse, en réponse à un signal, passer d'un état inactif à un état actif, orchestrant ainsi un remodelage du cytosquelette en clivant un ensemble de substrats. La calpaïne 3 participerait d'ailleurs également à ce remodelage en intervenant en amont du système ubiquitine-protéasome (Kramerova *et al.*, 2005).

D'autre part, il a été décrit que l'absence de calpaïne 3 est associée à une perturbation de la voie NF- κ B, aussi bien chez les patients atteints de calpaïnopathie que dans le modèle de souris déficient en calpaïne 3 (Baghdiguian *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2000). Ces situations pathologiques aboutissent à une augmentation de l'apoptose musculaire, suggérant que la calpaïne 3 pourrait participer à une régulation positive de cette voie et favoriser la survie des fibres musculaires en conditions de stress.

De façon très intéressante, dans la ligne M, la calpaïne 3, se lie à la région Mex5 de la titine (Kinbara *et al.*, 1997), qu'elle est capable de cliver (Kramerova *et al.*, 2004; Taveau *et al.*, 2003). Cette coupure pourrait abolir des interactions entre la titine et ses partenaires ou modifier la conformation de la titine, entraînant un remaniement du cytosquelette. De plus, des mutations dans la région Mex6 de la titine sont responsables des pathologies TMD et LGMD2J citées précédemment pour lesquelles une réduction secondaire de calpaïne 3 est observée (Haravuori *et al.*, 2001). Ces mutations pourraient empêcher l'interaction normale entre la calpaïne 3 et la titine et résulter en une déstabilisation de la calpaïne 3 expliquant la réduction secondaire de son expression. D'autre part, la calpaïne 3 est également présente dans le disque Z (Taveau *et al.*, 2003) et interagit directement avec la titine au niveau de la bande I (Sorimachi *et al.*, 1995). Il semble donc que la calpaïne 3 et la titine soient unies par une relation fonctionnelle complexe et qu'elles participent l'une et l'autre au maintien de l'homéostasie musculaire.

4.4 Un complexe d'intérêt : le complexe C3/titine

Dans la région N2A, la titine est associée à de nombreux partenaires, en particulier à la calpaïne 3. A ce niveau, elles feraient toutes-deux partie d'un complexe multiprotéique comprenant la myopalladine et trois protéines de la famille des Muscle Ankyrin Repeat Proteins (MARPs): Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP), Ankyrin repeat protein domain 2 (Ankrd2) et Diabetes related Ankyrin Repeat Protein (DARP). Les trois protéines sont exprimées dans le muscle squelettique et le muscle cardiaque : CARP est essentiellement exprimé dans le tissu cardiaque, DARP est exprimé dans le muscle squelettique alors qu'Ankrd2 est exprimé à des niveaux comparables dans les deux tissus (Miller *et al.*, 2003).

Ce complexe, situé à proximité du segment élastique de la titine, pourrait être impliqué dans la perception de signaux mécaniques tels que l'étirement des fibres (Miller *et al.*, 2003) (figure 11). De plus,

CARP et la calpaïne 3 ont aussi été mis en évidence dans le noyau suggérant qu'ils sont capables de se déplacer d'un compartiment subcellulaire à un autre (Baghdiguian *et al.*, 1999; Bang *et al.*, 2001b; Miller *et al.*, 2003; Sorimachi *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1997). Ces éléments permettent de les soupçonner de participer à des voies de signalisation.

La protéine **CARP** pourrait jouer un rôle dans la régulation de la masse musculaire. En effet, dans le cœur, elle semble être associée à l'hypertrophie (Aihara *et al.*, 2000a; Arber *et al.*, 1997; Ihara *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003; Nagueh *et al.*, 2004; Zolk *et al.*, 2002) et son expression, dans le muscle squelettique, est stimulée dans des situations hypertrophiques aussi bien que lors de conditions atrophiques (Bakay *et al.*, 2002; Barash *et al.*, 2004; Baumeister *et al.*, 1997; Carson *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Hentzen *et al.*, 2005; Nakada *et al.*, 2003a; Nakada *et al.*, 2003b; Nakamura *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005; Witt *et al.*, 2004).

Ces informations permettent de proposer l'hypothèse d'une participation de CARP et plus précisément du complexe comprenant CARP, la **calpaïne 3** et la **titine** dans des phénomènes de remodelage.

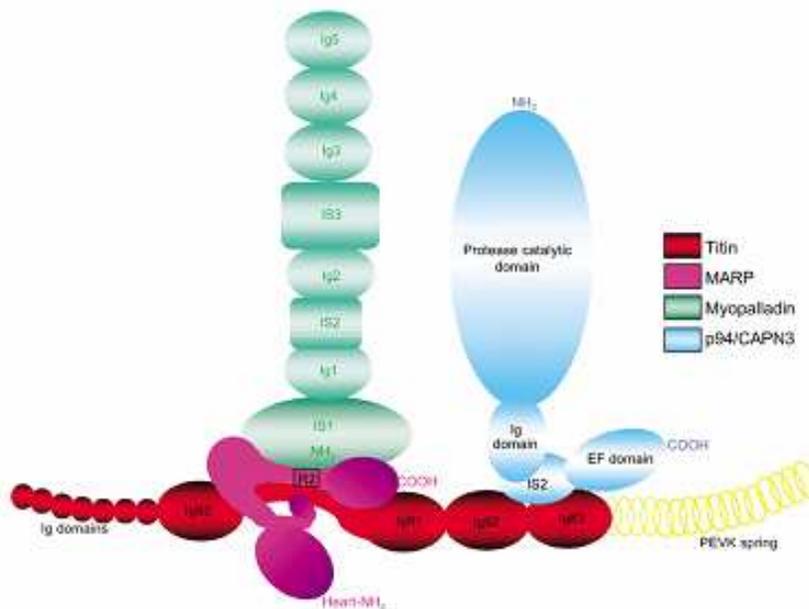


Figure 11 : complexe Calpaïne 3-Titine N2A-CARP

5 Objectifs et présentation de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre des projets de l'équipe « Dystrophies Des Ceintures » (de Généthon) dont l'objectif est de développer des solutions thérapeutiques pour les dystrophies des ceintures, myopathies pour lesquelles il n'existe pas encore de traitement. Cette thèse vise notamment à préciser le rôle de la calpaïne 3 dans la physiologie du muscle squelettique et à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques causés par son altération ou sa déficience dans la dystrophie des ceintures de type 2A. D'autre part, ce travail a également pour objectif de documenter les connaissances fondamentales sur le muscle squelettique et en particulier sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la masse

musculaire. Cela pourrait permettre d'envisager des axes thérapeutiques pour d'autres myopathies, en limitant au moins la fonte musculaire observée chez les malades.

Protéase à substrats multiples, la calpaïne 3, dont le signal d'activation est inconnu, pourrait avoir un rôle essentiel dans les phénomènes de remodelage sarcomérique (Duguez *et al.*, 2006; Kramerova *et al.*, 2005). En effet, son activité pourrait permettre de réguler la structure des fibres musculaires, ainsi que l'expression génique et l'équilibre entre synthèse et dégradation des protéines. Au cours de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'existence d'une relation fonctionnelle entre la calpaïne 3 et la titine, en particulier au niveau du complexe multiprotéique dont elles font partie dans la région N2A du sarcomère. Au sein de ce complexe moléculaire, un nouveau substrat de la calpaïne 3 a été identifié: la protéine régulatrice de transcription, CARP. Nos résultats suggèrent que ce clivage aurait pour but de modifier la localisation subcellulaire de ce facteur régulateur de la transcription et par conséquent de réguler sa fonction au sein du noyau.

D'autre part, la fonction de CARP étant essentiellement décrite dans le muscle cardiaque, nous nous sommes intéressés à son rôle physiologique dans le muscle squelettique en utilisant comme stratégie l'étude de l'effet de sa surexpression *in vitro*, dans des cellules musculaires et *in vivo*, dans des muscles de souris.

Enfin, plusieurs études ayant témoigné d'une dérégulation de l'expression de CARP au cours des processus dystrophiques et/ou atrophiques dans le muscle, nous avons souhaité explorer l'hypothèse de l'implication de CARP dans les mécanismes physiopathologiques.

RESULTATS

1 Etude de la relation fonctionnelle entre la calpaïne 3 et CARP

1.1 Contexte

La caractérisation du rôle physiologique de la calpaïne 3 représente l'un des objectifs de notre laboratoire puisqu'elle pourrait permettre de développer des solutions thérapeutiques contre la dystrophie des ceintures de type de 2A, pathologie due à la déficience en calpaïne 3. Une meilleure compréhension de la fonction de la calpaïne 3 permettrait également d'approfondir les connaissances fondamentales sur la physiologie du muscle squelettique. Notre méthode pour atteindre cet objectif consiste notamment en l'identification des cibles de cette protéase à substrats multiples. Précédemment dans le laboratoire, des expériences d'expression ectopique de la calpaïne 3 dans différents types cellulaires non musculaires, ont permis de mettre en évidence une altération du cytosquelette cellulaire, conduisant à une perte de la morphologie et de l'adhésion cellulaire (Taveau *et al.*, 2003). Dans ce contexte, un certain nombre de protéines en rapport avec ce phénotype ont été proposées comme candidates et plusieurs substrats de la calpaïne 3 ont pu être identifiés tels que la taline, la vinexine α et l'eitrine, qui sont des protéines des adhésions focales, ainsi que les filamines A et C et la titine, qui sont des protéines du cytosquelette musculaire (Taveau *et al.*, 2003).

Lors de l'étude réalisée au cours de cette thèse, nous avons souhaité rechercher de nouveaux candidats clivables par la calpaïne 3. Pour cela, nous avons choisi d'examiner les protéines décrites pour être localisées à proximité de la calpaïne 3 et de la titine. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux molécules présentes au niveau de la bande N2A du sarcomère où le domaine IS2 de la calpaïne 3 se lie à la titine au niveau de ses répétitions Ig82 et 83 (Sorimachi *et al.*, 1995).

Dans cette région située à proximité du segment élastique PEVK de la titine, la calpaïne 3 ferait partie d'un complexe moléculaire potentiellement impliqué dans la réponse au stress mécanique (Miller *et al.*, 2003). Parmi les membres de ce complexe, les protéines de la famille des MARPs (CARP, Ankrd2 et DARP) qui interagissent avec un motif riche en résidus tyrosine compris entre les répétitions Ig 80 et 81 de la titine, ont spécialement attiré notre attention. Plusieurs études suggèrent que les protéines MARPs seraient impliquées dans des voies de signalisation activées lors de conditions d'étirement : (i) dans le muscle squelettique, l'expression d'Ankrd2 augmente après un étirement (Kemp *et al.*, 2000; McKoy *et al.*, 2005) et MyoD, un facteur de transcription dont l'expression augmente dans ces conditions (Zador *et al.*, 1999) est capable d'activer le promoteur d'Ankrd2 (Bean *et al.*, 2005). (ii) Après étirement de cardiomyocytes en culture, l'expression de CARP et DARP augmente au niveau du sarcomère ainsi que dans le compartiment nucléaire (Miller *et al.*, 2003). Il nous a donc paru nécessaire de déterminer s'il existait une relation entre les MARPs et la calpaïne 3.

1.2 Résultats

1.2.1 *Clivage de CARP par la calpaïne 3*

1.2.1.1 **CARP est un substrat de la calpaïne 3 *in vitro***

Afin de déterminer s'il pourrait exister une relation fonctionnelle entre les protéines MARPs et la calpaïne 3, nous avons d'abord testé l'hypothèse d'un clivage de CARP et/ou Ankrd2 par la calpaïne 3. Ne disposant pas, au moment de cette étude, d'anticorps efficaces pour détecter les protéines CARP et Ankrd2

par western-blot ou immuno-histologie, nous avons cloné les séquences murines de CARP et d'Ankrd2 dans un vecteur d'expression eucaryote (*fiche technique n°1*). Nous avons choisi pour cela un plasmide qui porte également la séquence d'une étiquette (V5) et qui permet la synthèse de protéines de fusion CARP-V5 et Ankrd2-V5 facilement détectables lors de nos expériences.

La co-transfection de fibroblastes NIH3T3 par les plasmides pcDNA3.1-CARP-V5 ou pcDNA3.1-Ankrd2-V5 et pTOM-CAPN3 nous a permis d'étudier l'effet de l'expression ectopique de la calpaïne 3 sur ces substrats putatifs (CARP et Ankrd2) (*fiche technique n°2*). Dans ce système non-musculaire, les inhibiteurs spécifiques de la calpaïne 3 seraient absents, la protéase s'activerait spontanément en s'autolysant et serait donc constitutivement active. Nous avons analysé les protéines extraites de ces cellules par western-blot (*fiche technique n°3*) et avons détecté les bandes correspondant aux fragments à 55kD et 58 kD de la calpaïne 3, confirmant que la protéase est bien autolysée et donc active dans notre système (*figure 1, hybridation anti-C3*).

Dans cette expérience, les protéines CARP et Ankrd2 sont reconnues par leur extrémité C terminale portant l'étiquette V5 contre laquelle est dirigé l'anticorps utilisé (*figure 1, hybridation anti-V5*). CARP est détecté sous forme entière à un poids moléculaire de 43 kDa en absence de calpaïne 3. En présence de calpaïne 3, deux formes de CARP sont révélées : la forme entière minoritaire (43kDa) et une forme plus abondante de poids moléculaire inférieur (39 kDa), représentant le fragment C terminal issu de la coupure de CARP. Ankrd2 est détecté au même poids moléculaire (deux isoformes sont détectées à 46 et 48 kDa) en présence et en absence de calpaïne 3. Cette étude a donc révélé que la protéine CARP est clivée en présence de calpaïne 3, tandis qu'Ankrd2 ne l'est pas. C'est pourquoi nous avons ensuite restreint notre projet à l'étude de la relation fonctionnelle entre CARP et la calpaïne 3.

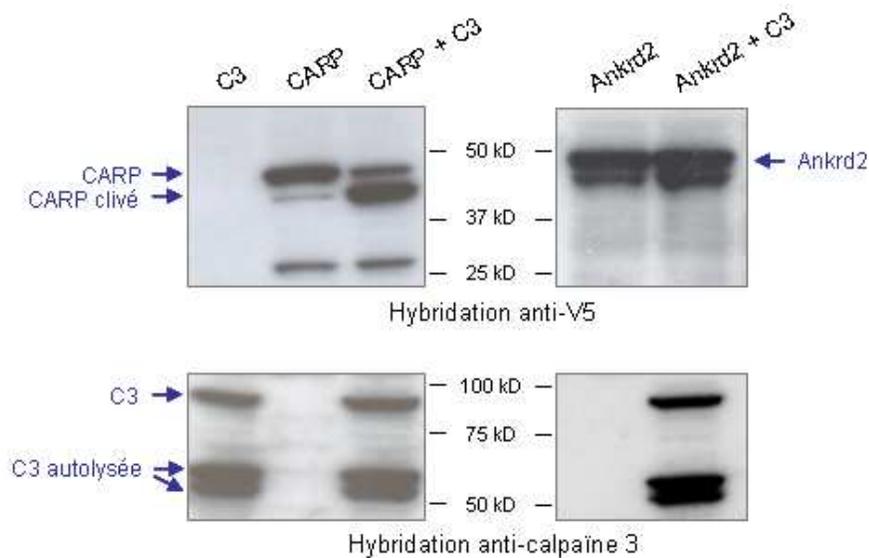


Figure 1 : CARP est clivé par la calpaïne 3

L'analyse par western-blot des protéines extraites de fibroblastes NIH3T3 surexprimant CARP ou Ankrd2 en présence et en absence de calpaïne 3 (C3) montre que CARP (43 kDa) est clivé par la calpaïne 3, produisant un fragment C terminal de 39 kDa et qu'Ankrd2 (46 et 48 kDa) n'est pas un substrat de la protéase. Les protéines CARP et Ankrd2 sont révélées par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope V5. Le profil de la calpaïne 3, révélé par un anticorps polyclonal de lapin, présente trois bandes : celle correspondant à la forme entière (94 kDa) et celles correspondant à des fragments d'autolyse (58 et 55 kDa).

1.2.1.2 La calpaïne 3 et CARP sont capables d'interagir

Bien que l'interaction directe entre CARP et la calpaïne 3 ne soit pas nécessaire au clivage, l'hypothèse d'une telle relation entre la protéase et son substrat a ensuite été testée grâce au système de double hybride chez la levure. Cette technique permet d'identifier une interaction protéine-protéine *in vivo* par reconstitution d'un activateur transcriptionnel (*fiche technique n°4*). Dans ce système, lorsque les protéines d'intérêt interagissent directement (après clonage de leurs ADNc et transformation de levures), l'activateur transcriptionnel devient fonctionnel et les levures prolifèrent sur un milieu dépourvu d'histidine.

Comme attendu, nous avons obtenu un résultat positif avec des levures transformées par les plasmides codant la titine et la calpaïne 3 (témoin positif) (figure 2). De la même manière, nos résultats démontrent que dans ce système CARP et la calpaïne 3 interagissent de façon directe. En revanche, lorsque l'expérience est réalisée avec un plasmide codant la calpaïne 3 et un plasmide vide, les levures ne sont pas capables de proliférer sur le milieu de sélection (témoin négatif) (figure 2).

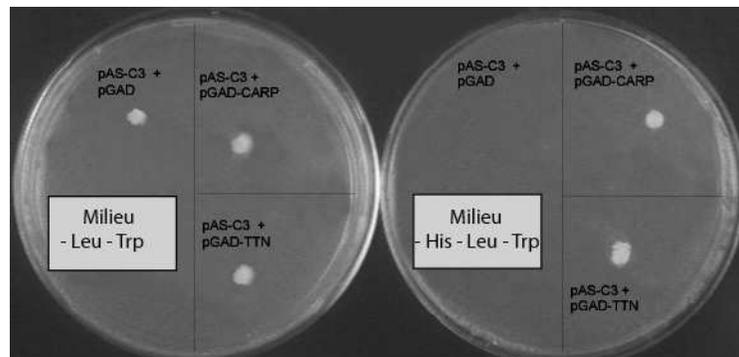


Figure 2 : CARP interagit directement avec la calpaïne 3

Dans ce système de double-hybride, le gène rapporteur HIS3 est activé par l'interaction directe de CARP avec la calpaïne 3 (C3), permettant aux levures de proliférer sur un milieu dépourvu d'histidine, tryptophane et leucine (à droite), les levures étant toutes capables de proliférer sur un milieu non-sélectif (à gauche). L'expérience de transactivation du gène rapporteur par le test d'interaction calpaïne3-titine (TTN) est utilisée comme témoin positif. L'expérience réalisée après transformation des levures par le plasmide codant la calpaïne 3 et un plasmide vide représente le témoin négatif.

1.2.1.3 Le clivage de CARP n'est pas spécifique de la calpaïne 3

Afin de préciser si le clivage de CARP est spécifique de la calpaïne 3, l'activité des calpaïnes ubiquitaires 1 et 2 sur la protéine CARP a été étudiée en réalisant le même type d'expériences que précédemment avec des plasmides d'expression codant les calpaïnes ubiquitaires 1 et 2 (pcDNA3-GS-CAPN1 et pcDNA3-GS-CAPN2).

Lors de l'analyse par immunoblot, les protéines CARP, calpaïne 1 et calpaïne 2 ont été détectées en utilisant le même anticorps dirigé contre l'épitope V5. Dans le cas de la calpaïne 2, aucune bande correspondant au fragment C terminal de CARP clivé n'a été détectée (figure 3A): la calpaïne 2 ne clive donc pas CARP dans ces conditions. Dans le cas de la calpaïne 1, une bande est détectée au poids moléculaire du fragment C terminal de CARP clivé. Cette bande est également détectée dans les puits correspondant aux extraits protéiques des cellules surexprimant la calpaïne 1 seule. Toutefois, il est possible que la calpaïne 1 ait protéolysé CARP et que la bande correspondant au fragment généré par ce clivage soit superposée à la bande spécifique de la calpaïne 1, empêchant l'interprétation correcte de nos résultats.

Dans le but de résoudre cette ambiguïté, l'expérience de surexpression de CARP en présence et en absence de calpaïne 1 dans des fibroblastes, a été renouvelée. Lors de cette seconde expérience, les échantillons protéiques ont été soumis à une électrophorèse en deux dimensions (*fiche technique n°3*). Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de deux critères : leur point isoélectrique et leur poids moléculaire ; elle a donc permis de séparer les bandes spécifiques à chacune des protéines CARP et calpaïne 1.

Le profil ainsi obtenu pour CARP en présence de calpaïne 1 s'est révélé identique à celui obtenu lors du clivage de CARP par la calpaïne 3 (*figure 3B*): la calpaïne 1 peut donc cliver CARP et le clivage de CARP n'est par conséquent pas spécifique de la calpaïne 3.

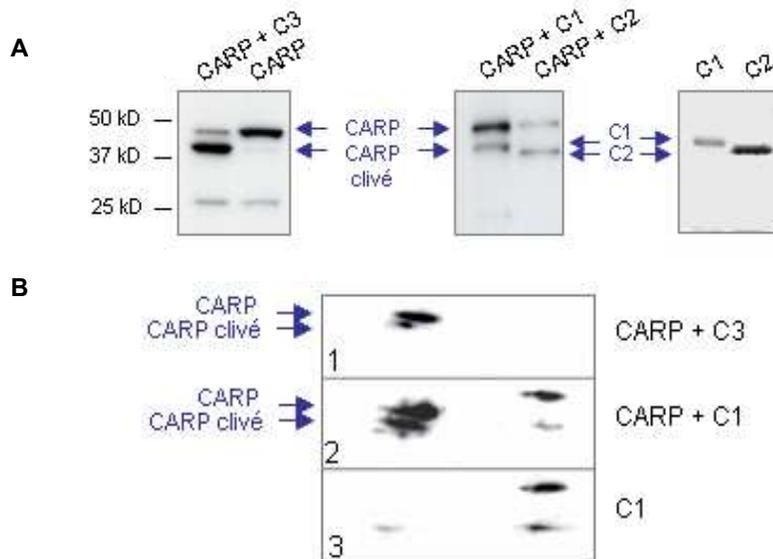


Figure 3 : CARP est clivé par la calpaïne 1

A/ Analyses par western-blot des extraits protéiques de fibroblastes surexprimant CARP en présence de calpaïne 3 (C3), calpaïne 1 (C1) ou calpaïne 2 (C2). Les protéines CARP, C1 et C2 sont détectées avec le même anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope V5. En présence de C2, aucune bande à 39 kDa n'est détectée, indiquant que C2 ne clive pas CARP. En présence de C1, comme en présence de C3, le profil de CARP présente une bande à 39 kDa. Cette bande est également détectée lorsque les cellules sont transfectées uniquement par le plasmide codant C1, elle est donc spécifique de C1 mais pourrait masquer la bande correspondant au fragment issu du clivage. **B/** L'électrophorèse en 2 dimensions permet de différencier les bandes spécifiques de C1 (3) de celles spécifiques de CARP (1). Le profil de CARP en présence de C1 (2) présente, en plus des bandes spécifiques de C1, les 2 bandes correspondant à CARP entier et CARP clivé, indiquant que C1 clive CARP. Le clivage de CARP n'est donc pas spécifique de la calpaïne 3.

1.2.1.4 La calpaïne 3 clive CARP dans une région très structurée

D'après les données obtenues à partir des substrats préalablement identifiés pour la calpaïne 3, il n'existe pas de séquence consensus ciblée par cette protéase. Nous avons donc recherché expérimentalement le site exact de la coupure de CARP. En plus d'une région particulièrement structurée -le domaine coiled-coil-, la protéine CARP comporte quatre domaines « ankyrin repeat » potentiellement responsables d'interactions avec d'autres protéines. Elle est également caractérisée par la présence de deux motifs PEST (séquences riches en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (I)) (*figure 4A*). Ces zones sont habituellement évocatrices de régions d'instabilité protéique, suggérant que le site de clivage par la calpaïne 3 pourrait s'y situer.

Afin de déterminer la position du site de clivage, des fibroblastes ont été transfectés avec le plasmide pcDNA3.1D/ Δ Nter1 codant une protéine CARP tronquée au niveau de son extrémité N terminale jusqu'en aval du premier domaine PEST (figure 4A). L'analyse de cette protéine par western-blot a permis de démontrer que le site de clivage ne se situait pas dans le domaine PEST comme nous le supposions, puisque la protéine Δ Nter1 ne semble pas être de même poids moléculaire (apparent en électrophorèse) que le fragment C terminal issu de la coupure de CARP par la calpaïne 3. De plus, en présence de calpaïne 3, cette protéine est clivée et ce clivage produit le fragment attendu (figure 4B).

Plusieurs plasmides (pcDNA3.1D/ Δ Nter2, 3 et 4), codant des fragments de CARP de tailles différentes correspondant à des délétions successives de divers domaines (figure 4A), ont été construits et les mêmes expériences que précédemment ont été réalisées dans le but de localiser la région contenant le site de clivage de CARP par la calpaïne 3 (fiches techniques n°1, 2 et 3).

Les analyses par western-blot pour ces différents fragments nous ont permis de localiser la coupure dans le domaine coiled-coil. En effet, le fragment Δ Nter2, qui correspond à la protéine CARP tronquée au niveau de son extrémité N terminale jusqu'au milieu du domaine coiled-coil, est détectée au même poids moléculaire que le fragment issu du clivage de CARP par la calpaïne 3 (figure 4B). Ce fragment n'est pas capable d'être clivé par la calpaïne 3, confirmant qu'il ne comprend pas le site de clivage dans sa séquence. Pour la suite et en vue de simplification, ce fragment sera renommé DeltaNer et le fragment plus court N terminal (non visible lors de notre expérience de clivage) sera appelé Nter.

De façon très intéressante, grâce à l'utilisation de la base de données « WoLF PSORT » (<http://wolfsort.org/>), nous avons pu mettre en évidence la présence d'un signal de localisation nucléaire bipartite (ou Nuclear Localisation Signal (NLS)) au sein du domaine coiled-coil dans la région ciblée par la protéase. Ces résultats suggèrent que la coupure de CARP par la calpaïne 3 aurait lieu dans une région très structurée et pourrait avoir comme conséquence la destruction d'un NLS, insinuant des conséquences possibles sur la localisation subcellulaire de la protéine (figure 4A).

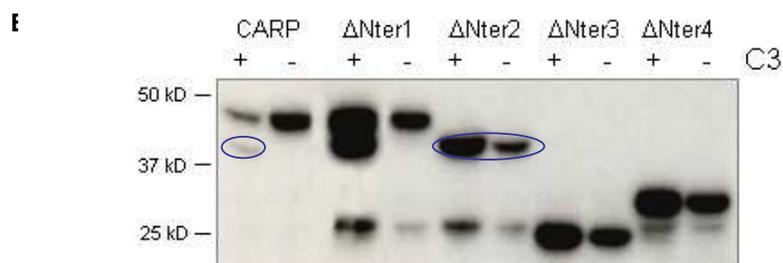
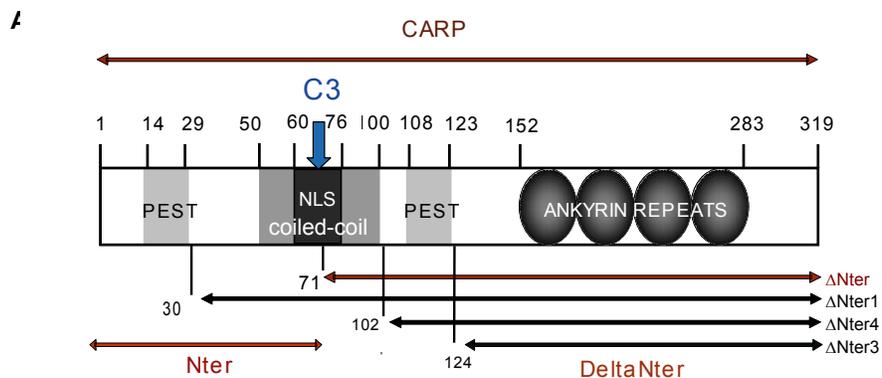


Figure 4 : la calpaïne 3 clive CARP dans une région très structurée

A/ Représentation schématique de la structure de CARP. Le site de clivage par la calpaïne 3 est localisé au niveau de la flèche bleue. Les constructions Δ Nter1, Δ Nter2, Δ Nter3, Δ Nter4 et Nter correspondant à des délétions successives des domaines sont repérées sur la représentation de CARP. **B/** Analyse par western-blot du profil d'expression des fragments Δ Nter1, Δ Nter2, Δ Nter3 et Δ Nter4 en présence (+) et en absence (-) de calpaïne 3 (C3) après surexpression dans des fibroblastes NIH3T3. Le fragment Δ Nter2, révélé par un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope V5 est détecté au même poids moléculaire (39 kDa) que le fragment issu du clivage de CARP par la calpaïne 3, suggérant que le site de clivage est localisé dans la région comprenant le domaine coiled-coil et plus précisément au niveau du NLS.

1.2.2 Conséquences de la coupure de CARP par la calpaïne 3

1.2.2.1 Conséquences de la coupure de CARP sur sa localisation

Pour déterminer si la coupure par la calpaïne 3 pouvait modifier la distribution subcellulaire de CARP, nous avons dans un premier temps qualifié la localisation de CARP *in cellulo*, puis *in vivo*, avant d'étudier la localisation des différents fragments générés par le clivage.

1.2.2.1.1 Etude de la localisation de CARP

1.2.2.1.1.1 Localisation de CARP *in cellulo*

La localisation de CARP dans des extraits de cellules d'origine tissulaire différente surexprimant la protéine de fusion CARP-V5 a été étudiée par western-blot (hybridation anti-épitope V5) après fractionnement subcellulaire (*fiche technique n°3*). Nous avons montré que dans des cellules fibroblastiques NIH3T3, pour lesquelles la transfection est généralement très efficace, la protéine CARP se situe principalement dans la fraction cytosolique, bien qu'elle soit aussi clairement présente dans la fraction nucléaire et dans les membranes (*figure 5A*).

D'autre part, la qualité du fractionnement subcellulaire a été vérifiée en hybridant à nouveau les membranes pour détecter des protéines spécifiques de chaque compartiment cellulaire : HSP27 pour le cytosol, γ -sarcoglycan pour les membranes, histone H1 pour le noyau et vimentine pour le cytosquelette (*figure 5B*). L'efficacité du fractionnement subcellulaire a ainsi été confirmée.

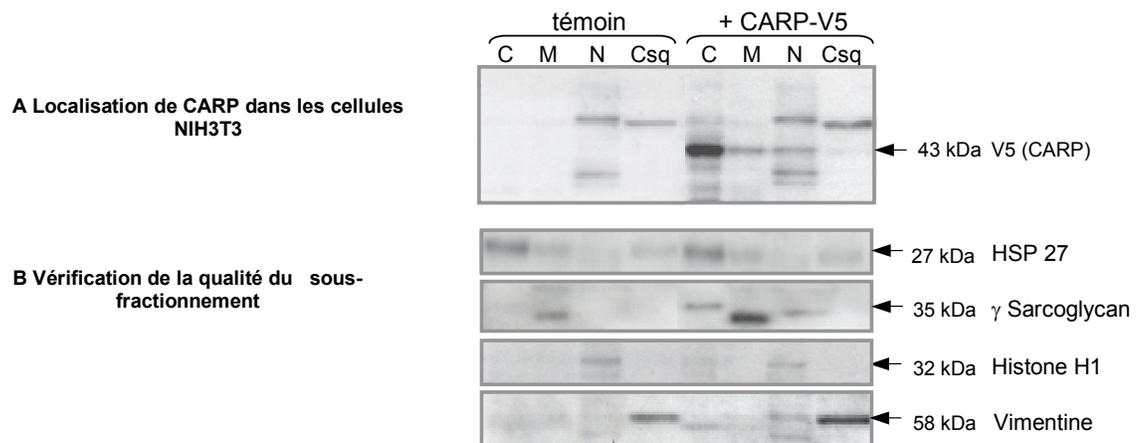


Figure 5 : La localisation de CARP a été étudiée *in cellulo* après sous-fractionnement subcellulaire et analyse par western-blot

A Western-blot révélant l'expression de CARP dans les différentes fractions protéiques obtenues après surexpression de CARP dans des cellules NIH3T3 (C pour Cytosol, M pour Membranes et organelles excepté le noyau, N pour Noyau et Csq pour Cytosquelette). L'hybridation est réalisée avec l'anticorps reconnaissant l'épitope V5. Les conditions témoins correspondent aux différentes fractions dans des cellules non-transfectées. **B**/ Validation de la qualité du fractionnement subcellulaire. Les membranes obtenues précédemment pour les extraits de cellules NIH3T3 sont successivement hybridées avec les anticorps dirigés contre HSP27, γ -sarcoglycan, histone H1 et vimentine.

Lors d'études utilisant des méthodes de sous-fractionnement subcellulaire, il est absolument impossible d'obtenir une séparation parfaite des différents organelles, et, bien que nous ayons vérifié la pureté des fractions par l'utilisation de marqueurs, il nous est apparu nécessaire de valider nos résultats par une autre méthode. La localisation de CARP dans les cellules NIH3T3 a donc été également étudiée par immuno-marquage. 24 heures après transfection, les cellules ont été fixées et la protéine CARP-V5 a pu être mise en évidence par l'anticorps anti-V5 (*fiche technique n°5*).

Les images, réalisées en microscopie confocale, confirment que la protéine se localise bien au niveau du noyau ainsi qu'à l'extérieur du compartiment nucléaire, très probablement dans le cytosol comme le suggèrent les résultats obtenus précédemment par western-blot (*figure 6*).

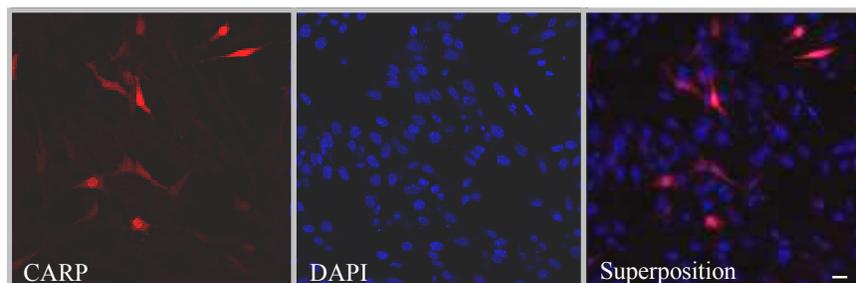


Figure 6 : La localisation de CARP a été étudiée par immuno-marquage dans les NIH3T3

Observation au microscope confocal (objectif 40X) de cellules NIH3T3 surexprimant la protéine CARP portant une étiquette V5. Les noyaux, marqués au DAPI, sont visualisés en bleu ; la protéine CARP, immuno-marquée grâce à un anticorps dirigé contre l'étiquette V5, est visualisée en rouge. Les barres d'échelle représentent 25 μ m.

Les cellules musculaires étant d'architecture et d'organisation plus complexe, la localisation de CARP pourrait être différente. Le même type d'étude a donc été réalisé dans des cellules musculaires C2, plus difficiles à transfecter que les NIH3T3, mais aussi plus adaptées à l'étude de la fonction d'une protéine musculaire. Contrairement à la situation précédente, CARP est détecté dans toutes les fractions, mais semble être plus abondant dans les fractions nucléaire et cytosquelettique (*figure 7*).

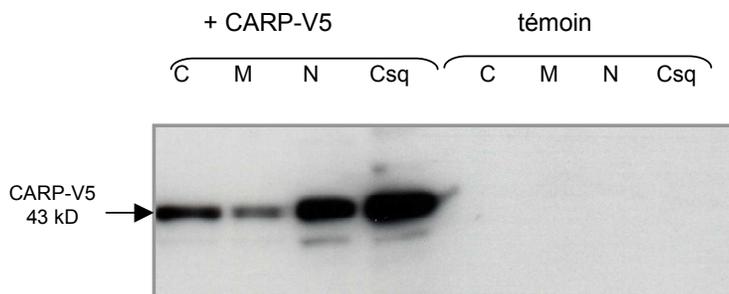


Figure 7 : La localisation de CARP a été étudiée *in cellulo* après sous-fractionnement subcellulaire et analyse par western-blot

Western-blot révélant l'expression de CARP dans les différentes fractions protéiques obtenues après surexpression de CARP dans des cellules C2 (C pour Cytosol, M pour Membranes et organelles excepté le noyau, N pour Noyau et Csq pour Cytosquelette). L'hybridation est réalisée avec l'anticorps reconnaissant l'épitope V5. Les conditions témoins correspondent aux différentes fractions dans des cellules non-transfectées.

De la même façon que précédemment pour les extraits NIH3T3, nous avons souhaité valider la localisation subcellulaire de CARP dans les cellulaires musculaires en utilisant une autre méthode. Nous avons choisi dans ce cas d'envisager une approche *in vivo*.

1.2.2.1.1.2 Localisation subcellulaire de CARP *in vivo* dans les muscles de souris

Afin de pouvoir confirmer la localisation subcellulaire de CARP dans le muscle squelettique, le plasmide « pJerry-CARP » codant une protéine CARP fluorescente (CARP fusionné à une étiquette fluorescente enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP)) (*fiche technique n°1*) a été injecté (injection intramusculaire suivie d'un électro-transfert) dans les muscles Tibialis Antérieurs (TA) de souris sauvages de souche 129SvPaslco âgées de 8 semaines (*fiche technique n°6*). Une semaine plus tard, les muscles injectés ont été observés en microscopie confocale, directement sur souris vivantes (*fiche technique n°5*).

La fluorescence présente un motif strié caractéristique de la localisation sarcomérique. Cette observation est en accord avec la localisation de CARP dans la région N2A de la titine observée dans le muscle cardiaque (Miller *et al.*, 2003). En plus de cette localisation cytosquelettique, CARP est fortement exprimé dans les noyaux des fibres squelettiques. Dans cet organelle, CARP semble être présent avec une concentration plus importante que dans le cytosquelette (*figure 8A*). D'autre part, au sein des noyaux, CARP semble se localiser au niveau de structures donnant un aspect ponctiforme au marquage fluorescent (*agrandissement, figure 8B*). Ces structures bien particulières restent non-identifiées à ce jour, bien que leur profil rappelle fortement celui des protéines PML (pour ProMyelocytic Leukemia) dans les corps nucléaires, compartiments dans lesquels Ankrd2 a déjà été observé (Kojic *et al.*, 2004).

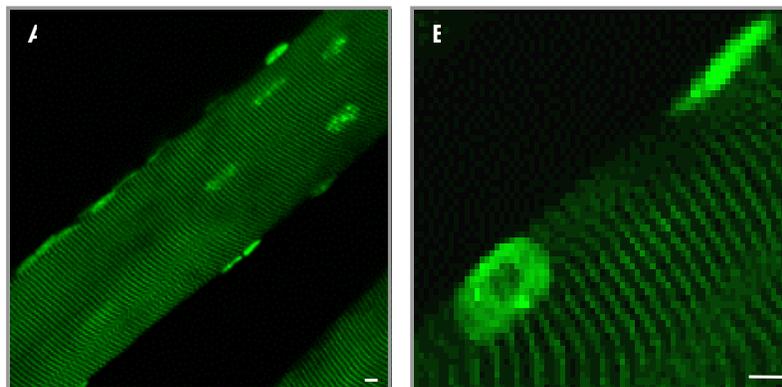


Figure 8 : *In vivo*, CARP est localisé au niveau des sarcomères et dans les noyaux des fibres musculaires

A/ 7 jours après injection de pJerryCARP dans les TA de souris 129SvPaslco, les muscles injectés sont observés directement sur souris vivantes par microscopie confocale (objectif 20X). CARP, en vert, est localisé au niveau des noyaux ainsi que dans les sarcomères. **B/** Agrandissement de l'image présentée en A. Les barres d'échelle représentent 5 µm.

1.2.2.1.2 Conséquences du clivage sur la localisation

Comme nous l'avons démontré précédemment, dans la cellule musculaire, CARP est localisé non-seulement au niveau du sarcomère, mais aussi dans le compartiment nucléaire. Puisque le NLS présent dans la séquence de CARP est détruit lors du clivage par la calpaïne 3, nous avons recherché quelles pouvaient être les conséquences de la coupure sur la localisation de la protéine.

Différents plasmides (pJerryCARP, pJerryDeltaNter, pJerryNter, *fiche technique n°1*) codant des protéines de fusion fluorescentes constituées de CARP ou des fragments issus du clivage, DeltaNter (le fragment C terminal) et Nter (le fragment N terminal), en fusion avec une étiquette fluorescente eYFP ont été injectés dans les muscles TA de souris (*fiche technique n°6*). Une semaine plus tard, les muscles injectés ont été observés, en microscopie confocale, directement sur souris vivantes (*fiche technique n°5*).

Aucune différence significative n'a été constatée quant à la localisation de CARP et de DeltaNter. Les deux constructions fluorescentes ont été détectées aussi bien au niveau des sarcomères qu'au niveau des noyaux des fibres (*figure 9A et B*). En revanche, le fragment court N-terminal issu du clivage (Nter) ne semble pas capable de transloquer dans le noyau et ne présente pas non-plus de striation spécifique d'une localisation sarcomérique de ce fragment (*figure 9C*). La fluorescence diffuse observée avec cette construction ainsi que l'absence de domaine physiologique connu dans cette région de CARP suggèrent que ce fragment pourrait être dénué d'activité biologique. C'est pourquoi par la suite, nous nous sommes intéressés exclusivement au fragment DeltaNter.

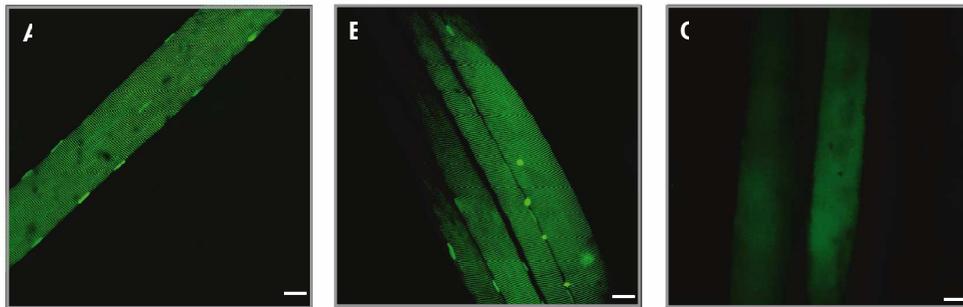


Figure 9 : Les deux fragments issus de la coupure de CARP sont localisés différemment

7 jours après injection de pJerryCARP (A), pJerryDeltaNter (B) ou pJerryNter (C) dans les TA de souris 129SvPaslco, les muscles injectés sont observés directement sur souris vivantes par microscopie confocale (objectif 20X). CARP et DeltaNter, en vert, sont localisés au niveau des noyaux ainsi que dans les sarcomères, tandis que le marquage Nter est diffus dans la fibre. Les barres d'échelle représentent 20 µm.

1.2.2.2 Conséquence du clivage de CARP sur son affinité pour le sarcomère

Bien que l'ensemble des résultats précédents suggère que le clivage de CARP pourrait avoir un effet sur sa localisation, nous n'avons pas constaté de différence visible quant à la localisation de DeltaNter par rapport à CARP non-clivé.

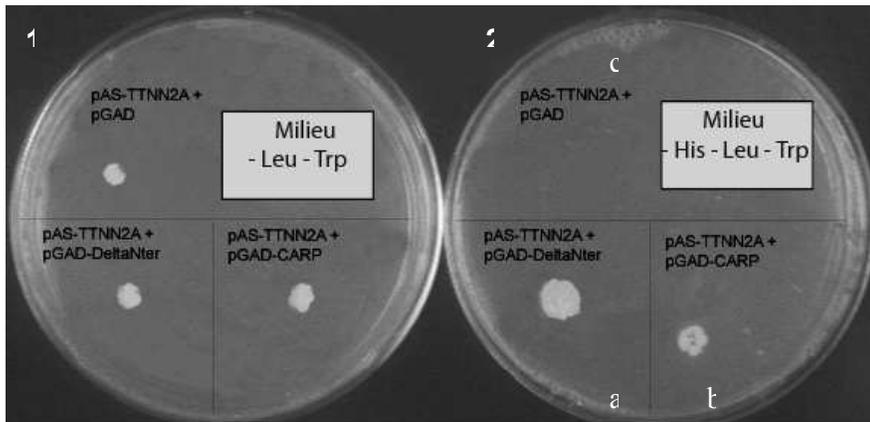
Afin d'en savoir davantage sur la localisation subcellulaire de CARP avant et après clivage, nous avons étudié, à l'aide du système de double-hybride chez la levure, la force de l'interaction entre CARP sous sa forme entière ou sous sa forme clivée et la région N2A du cytosquelette musculaire (*fiche technique n°4*).

La croissance des clones est plus importante dans le test de l'interaction entre DeltaNter et la région N2A de la titine (*figure 10A*), ce qui suggère que l'interaction détectée entre CARP et la région N2A de la titine serait plus forte après clivage.

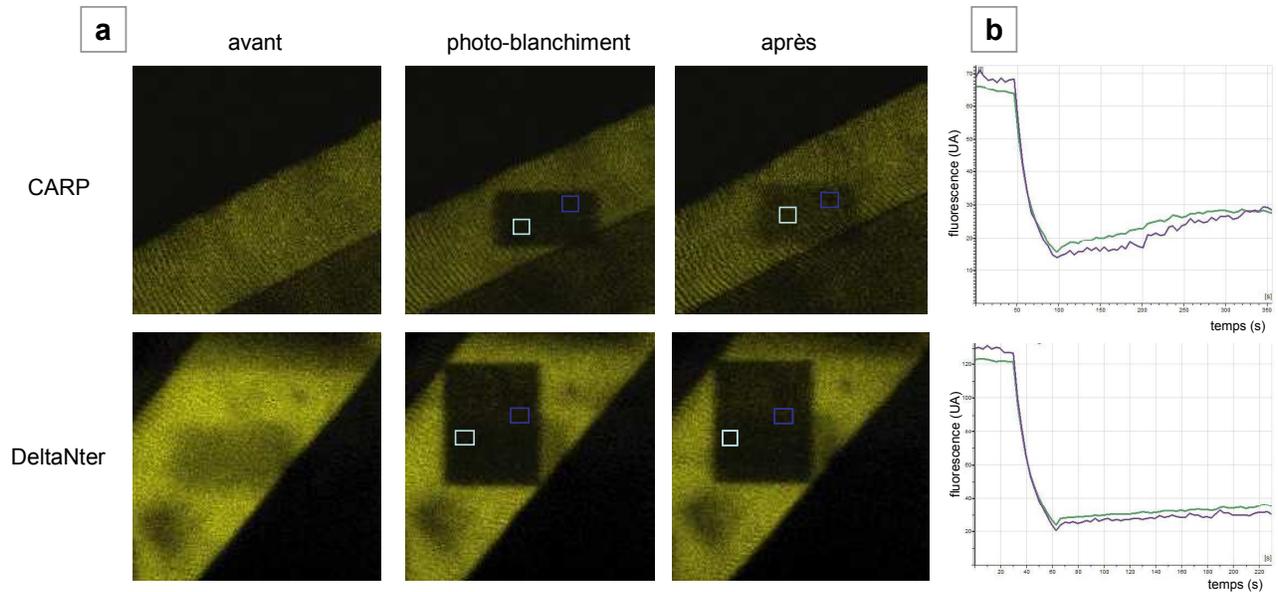
Ces résultats ont été confirmés et quantifiés par des expériences de FRAP réalisées sept jours après injection des plasmides pJerryCARP et pJerryDeltaNter dans les TA de souris normales (*fiche technique n°5*). Après photo-blanchiment, la vitesse de réapparition de la fluorescence a été mesurée dans les deux

conditions et s'est avérée plus faible dans le cas des muscles ayant reçu le plasmide codant DeltaNter, suggérant une mobilité moins importante pour la protéine de fusion DeltaNter-eYFP que pour CARP-eYFP (figure 10B). D'après nos résultats, nous pouvons envisager qu'après clivage par la calpaïne 3, CARP serait plus fortement lié au sarcomère, ce qui pourrait avoir pour effet de moduler son action dans le noyau.

A Expériences de double-hybride chez la levure



B Expériences de FRAP



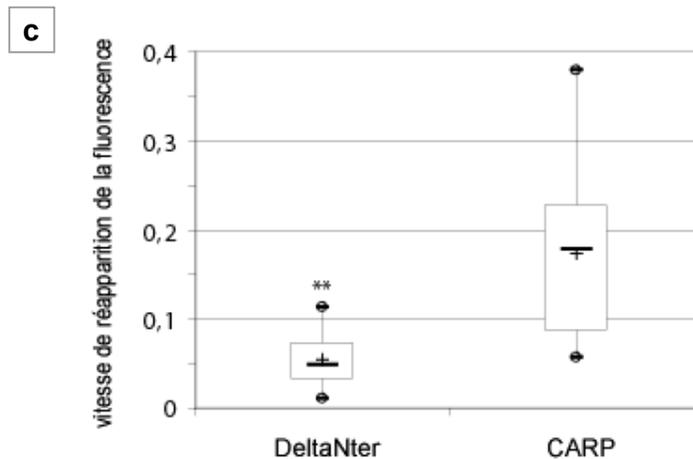


Figure 10 : le clivage de CARP par la calpaïne 3 renforce sa liaison avec la région N2A de la titine.

A/ Dans notre système de double-hybride chez la levure, l'interaction entre CARP et la région N2A de la titine est plus faible que l'interaction entre DeltaNter et la région N2A de la titine (comparer l'intensité des clones en a et b sur la boîte 2). La boîte 1 contient de l'histidine (témoin positif), toutes les levures sont capables de pousser. Sur la boîte 2 en c, le test réalisé après transformation des levures par le plasmide codant la région N2A de la titine et un plasmide vide est utilisé comme témoin négatif. **B/** 7 jours après injection de pJerryCARP ou pJerryDeltaNter dans les TA de souris 129svPaslco, les muscles injectés sont observés directement sur souris vivantes par microscopie confocale et des expériences de FRAP sont réalisées. Après photo-blanchiment de différentes ROI à l'aide d'un laser à 514 nm, la vitesse de récupération de la fluorescence est mesurée. **a/** images des muscles avant, pendant et 3 min après le photo-blanchiment. **b/** courbes indiquant l'intensité de fluorescence (en unités arbitraires) en fonction du temps (en secondes), pour les 2 ROI choisies et représentées sur les images de gauche. **c/** représentation des résultats en box-plots après analyse par le test Welch. $n = 5$, $**p < 0,01$. L'interaction entre CARP et la région N2A est plus forte après clivage par la calpaïne 3.

1.2.2.3 *In vivo*, la présence de la calpaïne 3 renforce l'affinité de CARP pour le sarcomère

Pour valider notre hypothèse d'un effet de la calpaïne 3 sur l'affinité de CARP pour le sarcomère, nous avons comparé la localisation subcellulaire de CARP en présence et en absence de calpaïne 3 en injectant dans le TA de souris normales (129SvPaslco) ou déficientes en calpaïne 3 (*C3-null*) le plasmide pJerryCARP (*fiche technique n°6*).

A nouveau, aucune différence n'a été constatée en ce qui concerne la localisation subcellulaire de CARP. Dans les muscles des souris sauvages, comme dans ceux des souris déficientes en calpaïne 3, CARP est localisé dans les noyaux ainsi qu'au niveau des sarcomères, position facilement reconnaissable par le pattern strié de la fluorescence (*figure 11A*).

De la même façon que précédemment, des expériences de FRAP ont été réalisées en injectant le plasmide pJerryCARP dans les deux modèles murins (*fiche technique n°5*). La vitesse de réapparition de la fluorescence dans les zones préalablement photo-blanchies est significativement plus faible pour les animaux témoins que celle observée pour les muscles des animaux déficients en calpaïne 3, suggérant que l'interaction entre CARP et la titine est plus forte en présence de calpaïne 3 (*figure 11B*). Ces résultats semblent confirmer qu'en présence de calpaïne 3, CARP se lie plus fortement au sarcomère, suggérant que la translocation nucléaire de CARP pourrait être un mécanisme contrôlé par l'activité de la calpaïne 3.

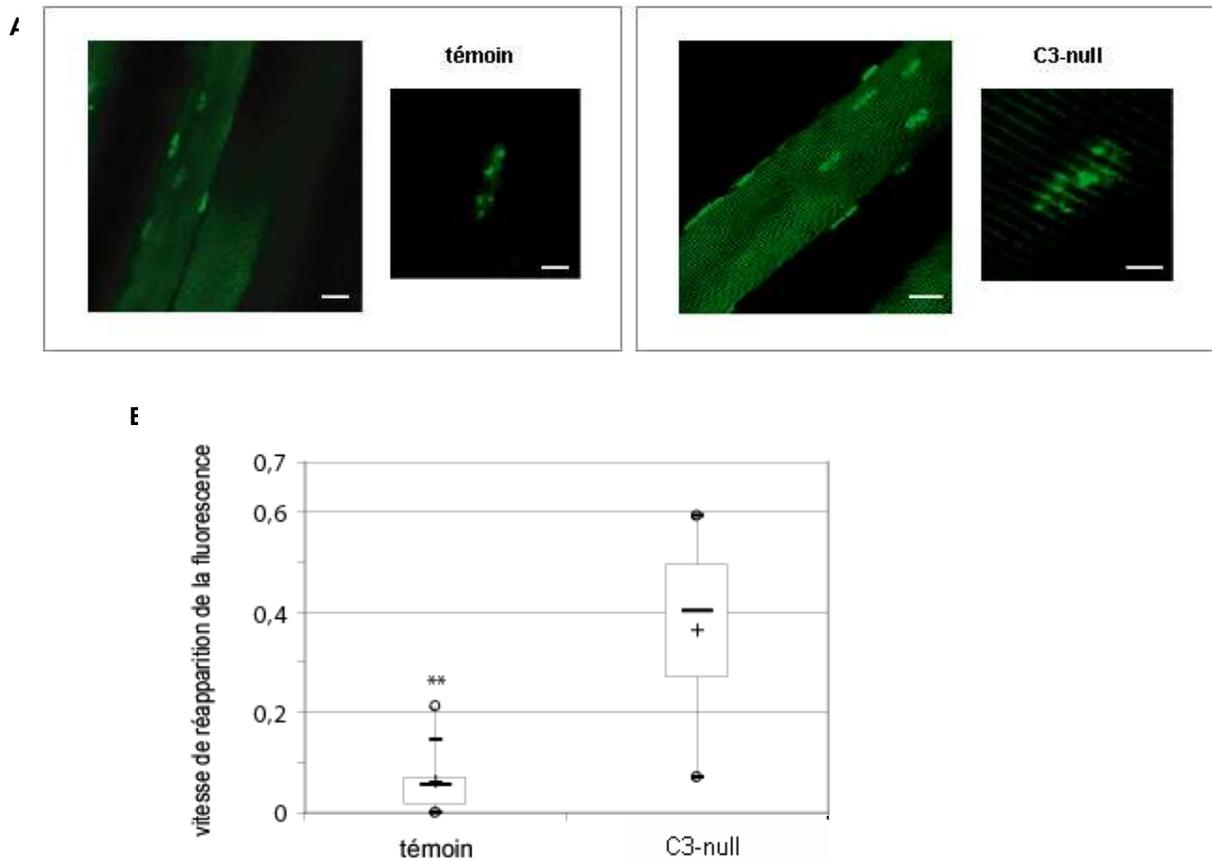


Figure 11 : La présence de la calpaïne 3 favorise l'interaction de CARP avec le sarcomère

A/ Observation en microscopie confocale de la localisation de CARP après injection et électrotransfert de pJerryCARP dans le TA de souris normales (à gauche) et de souris *C3-null* (à droite). Les barres d'échelle représentent 20 μm pour les images des fibres et 5 μm pour les agrandissements des noyaux. **B/** Les résultats des expériences de FRAP, réalisées sur les mêmes muscles, indiquent que la vitesse de réapparition de la fluorescence dans les zones photo-blanchies est plus faible en présence de calpaïne 3 (analyse statistique par le test Welch, $n = 10$, $**p < 0,01$).

1.3 Conclusion

L'exploration du rôle physiologique de la calpaïne 3 nous a permis de mettre en évidence une nouvelle cible de la protéase. En effet, la calpaïne 3 interagit avec la protéine CARP et est capable de la cliver *in vitro*. Cette coupure semble survenir dans une région relativement structurée de CARP, détruisant très probablement un signal de localisation nucléaire. A l'issue du clivage, deux fragments sont générés : le fragment C-terminal -de plus haut poids moléculaire- voit son affinité augmenter pour le sarcomère. Le clivage de CARP par la calpaïne 3 pourrait donc permettre de contrôler sa translocation nucléaire et, de ce fait, réguler sa fonction.

Afin de mieux comprendre le rôle physiologique de la calpaïne 3, nous avons souhaité dans un second temps caractériser la fonction de CARP dans le muscle squelettique.

2 Caractérisation de la fonction de CARP dans le muscle squelettique

2.1 Contexte

Comme mentionné précédemment, CARP est localisé au niveau des sarcomères ainsi qu'à l'intérieur du compartiment nucléaire. Or il a été décrit que, dans le cœur, CARP est capable de se lier au facteur de transcription YB1 pour inhiber son activité résultant en une régulation négative de la transcription du facteur cardiaque MLC-2V (Mysin Light Chain 2 Ventricular specific) (Zou *et al.*, 1997). CARP serait donc un facteur régulateur de la transcription et pourrait constituer un lien entre des signaux perçus par la fibre musculaire au niveau des sarcomères et la régulation génique s'opérant au sein du noyau.

Dans le but d'élucider les relations fonctionnelles entre la calpaïne 3 et CARP, il nous a été nécessaire de documenter le rôle de CARP dans le muscle squelettique. Nous avons orienté notre étude selon différents axes : (i) l'étude des conséquences moléculaires de sa surexpression, en examinant notamment son effet sur l'activité de facteurs de transcription et sur l'expression de gènes et (ii) l'identification de ses partenaires dans le muscle squelettique, en l'utilisant comme appât dans un système de double hybride chez la levure.

2.2 Résultats

2.2.1 *Effets de la surexpression de CARP dans des cellules musculaires*

Nous avons examiné les effets physiologiques de la surexpression de CARP dans des cellules musculaires squelettiques. Afin d'identifier les voies de signalisation impliquées, et prenant en considération sa fonction de facteur régulateur de la transcription dans le tissu cardiaque, les facteurs de transcription et les gènes régulés dans cette condition ont été recherchés.

2.2.1.1 **Effet de CARP sur l'activité de facteurs de transcription**

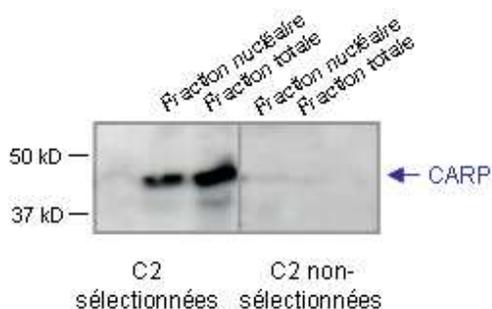
2.2.1.1.1 **Criblage des facteurs de transcription régulés en présence de CARP**

En interagissant par leurs séquences de liaison à l'ADN au niveau de motifs consensus spécifiques présents dans les promoteurs de certains gènes, les facteurs de transcription régulent la fréquence de l'initiation de la transcription et, par voie de conséquence, l'expression génique. Afin d'identifier les facteurs de transcription régulés par CARP dans le muscle squelettique, nous avons utilisé la technique de *DNA/Protein array* afin de comparer l'activité de liaison à l'ADN d'un grand nombre de facteurs de transcription en présence et en absence de CARP (*fiche technique n°7*). Les extraits nucléaires faisant l'objet de cette étude ont été obtenus à partir de cellules de la lignée C2 différenciées en myotubes et surexprimant CARP (*fiche technique n°3*).

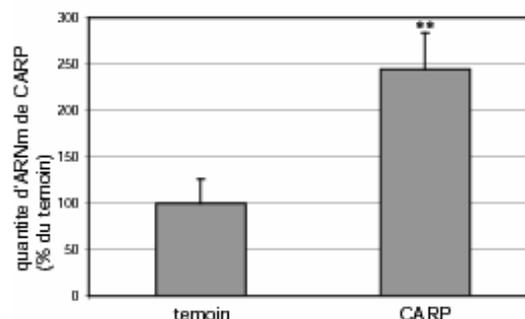
L'efficacité de transfection étant relativement réduite dans ce type cellulaire (environ 20%), nous avons enrichi notre population grâce au tri des cellules d'intérêt par le système pMACS KkII (*fiche technique n°2*). La qualité de la sélection a été vérifiée par western-bot (*figure 12A*). De plus, en vue de quantification du niveau de surexpression obtenu, nous avons également évalué l'expression de l'ARNm codant CARP par PCR quantitative en temps réel (RT-PCRQ) (*fiche technique n°8*) (*figure 12B*) : le niveau obtenu est de 2,5 fois supérieur à celui observé dans les cellules témoins.

Parmi les 150 facteurs de transcription présélectionnés et présents sur la membrane de *DNA-Protein array*, six d'entre eux semblent voir leur activité régulée différemment dans les extraits sur-exprimant CARP: Nuclear Factor kappaB (NF-κB), Forkhead box-containing protein O subfamily member 1 (FoxO1), Smad3/4, Myoocyte Enhancer Factor 1 (MEF1), Forkhead RELated ACTivator transcription factor 2 (FREAC2) et Early-region-2 transcription Factor 1 (E2F-1) (figure 12C).

A Sélection des cellules surexprimant CARP



B Expression de CARP



C Principaux résultats du criblage de l'activité des facteurs de transcription

	témoin	+ CARP	régulation
NF-κB			/ 2
FoxO1			x 2
Smad3/4			/ 2
MEF1			/ 2
FREAC-2			x 5
E2F1			/ 3,5

Figure 12 : Les activités de liaison à l'ADN de 6 facteurs de transcription sont régulées par CARP *in vitro*

A/ Des cellules C2 sélectionnées par le niveau de surexpression de CARP (transfection de pcDNA3.1-CARP-V5) sont différenciées en myotubes (5 jours de différenciation). L'efficacité de ce tri est vérifiée par hybridation avec un anticorps anti-V5 en western-blot. **B/** L'expression de CARP est quantifiée au niveau ARNm par RT-PCRQ et normalisée par rapport à l'expression du gène ubiquitaire de la phosphoprotéine (PO). Les résultats montrent que CARP est au moins 2 fois plus exprimé dans les C2 transfectées. n = 3 ** p<0,01. **C/** Un criblage des facteurs de transcription régulés en présence de CARP est ensuite réalisé à partir des fractions nucléaires extraites à partir de ces cellules. Les principaux résultats obtenus lors du criblage par la technique de DNA/Protein array sont présentés: l'intensité du signal est comparée entre les conditions témoins et les conditions de surexpression de CARP et le rapport entre les 2 activités estimé pour les différents facteurs.

2.2.1.1.2 Validation et quantification des résultats

Parmi les facteurs identifiés précédemment, FoxO1 et ceux de la famille NF-κB ont particulièrement attiré notre attention, puisqu'ils sont décrits pour intervenir lors de processus atrophiques de la cellule

musculaire (Hunter *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Penner *et al.*, 2001; Sandri *et al.*, 2004). Afin d'établir et de documenter le rôle de CARP dans ces événements, les résultats d'intérêt ont été confirmés par une méthode plus quantitative et les autres acteurs de cette voie recherchés. Nous avons également souhaité préciser quel est (ou quels sont) le(s) membre(s) de la famille NF- κ B dont l'activité est diminuée en présence de CARP. Par ailleurs, nous avons cherché à déterminer, par PCR quantitative, si les différences observées pour les activités de ces facteurs étaient liées ou non à une variation de leur expression.

L'analyse par TransAM (*fiche technique n°7*), une méthode basée sur la technique Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA), a permis de confirmer qu'*in vitro* la protéine CARP stimule -directement ou non- l'activité de liaison à l'ADN de FoxO1 et inhibe celle de NF- κ B p65, tandis qu'elle ne modifie pas celle de la sous-unité RelB du facteur NF- κ B (*figure 13*). Dans notre expérience, les autres membres de la famille NF- κ B (C-rel, p50 et p55) sont trop faiblement exprimés pour être détectés.

D'autre part, la surexpression de CARP ne semble pas modifier l'expression de ces protéines comme l'indiquent les résultats de PCR quantitative (*fiche technique n°8*) (*figure 13*). CARP semble donc agir sur les facteurs FoxO1 et NF- κ B p65 pour moduler leur activité sans modifier leur expression.

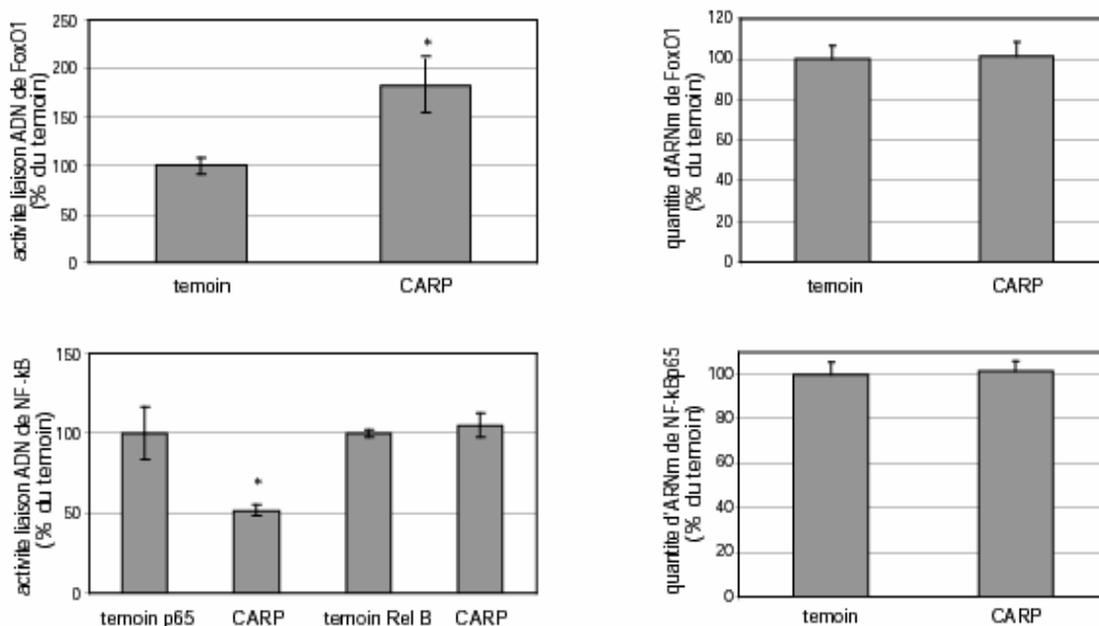


Figure 13 : La surexpression de CARP a un effet sur l'activité des facteurs FoxO1 et NF- κ B mais pas sur leur expression

Dans les cellules C2 (différenciées en myotubes pendant 10 jours), l'activité de liaison à l'ADN de FoxO1 est 1,8 fois plus importante en présence de CARP, celle de NF- κ B p65 est réduite d'un facteur 2 et celle de RelB n'est pas modifiée (à gauche). (Activités mesurées par technique TransAM). Les résultats de PCRQ (normalisés par rapport à l'expression du gène PO et exprimés en % de l'expression dans les extraits témoins) prouvent que la surexpression de CARP n'influence pas l'expression de FoxO1 et NF- κ B (à droite). n = 4 * p<0,05

Dans la littérature, les facteurs FoxO1 et NF- κ B sont décrits pour intervenir dans l'atrophie musculaire notamment en régulant la transcription de deux ubiquitine-ligases E3. FoxO1 stimule l'expression de MuRF1 et MAFbx (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004), tandis que la voie NF- κ B agit uniquement sur MuRF1 (Cai *et*

al., 2004), même s'il a été suggéré récemment qu'elle pourrait être impliquée dans la régulation de MAFbx dans des conditions particulières (Judge *et al.*, 2007).

Nous avons quantifié par PCR quantitative le niveau d'expression de ces deux ubiquitine-ligases E3 dans les extraits de cellules musculaires surexprimant CARP et dans les extraits témoins (*fiche technique n°8*). D'après nos résultats, l'expression de ces deux facteurs ne semble pas perturbée lors de la surexpression de CARP dans les cellules (*figure 14*). Ceci suggère fortement que la (ou les) voie(s) de signalisation en aval de CARP et impliquant FoxO1 et NF- κ B ferai(en)t intervenir d'autres acteurs qu'il serait intéressant d'identifier.

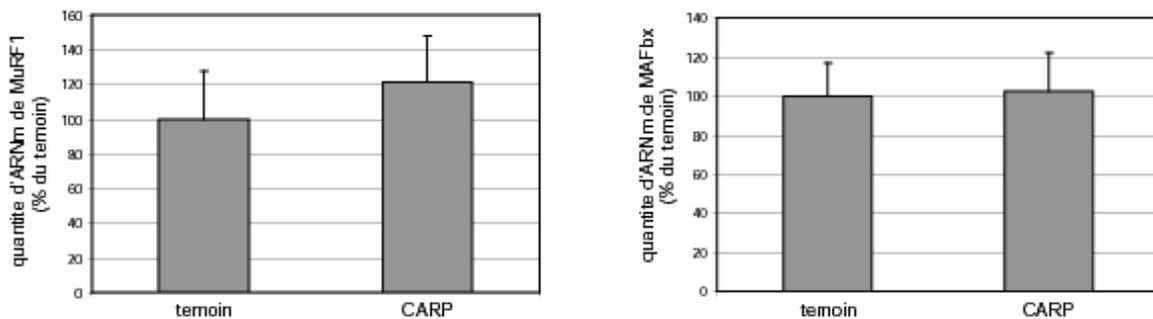


Figure 14 : L'expression de CARP n'a pas d'effet sur celle des protéines MuRF1 et MAFbx

L'expression de MuRF1 (à gauche) et de MAFbx (à droite) est quantifiée par RT-PCRQ et normalisée par rapport à celle du gène PO dans des cellules surexprimant CARP. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'expression mesurée dans les extraits témoins. n = 3

2.2.1.2 Effet de CARP sur l'expression de gènes

Ayant démontré que CARP est capable de réguler différents facteurs de transcription dans le muscle squelettique, nous avons également cherché à identifier les cibles en aval. Grâce à la technologie des puces à ADN (*Affymetrix*), le transcriptome de cellules C2 différenciées en myotubes et surexprimant CARP a été comparé à des conditions témoins (cellules C2 différenciées en myotubes surexprimant LacZ) (*fiche technique n° 9*).

La surexpression de CARP dans les extraits cellulaires a été vérifiée par western-blot (*fiche technique n°3*) et PCR quantitative (*fiche technique n°8*). Il est important de souligner que l'hybridation anti-V5 ne révèle que la protéine CARP-V5 exogène surexprimée dans les extraits tandis que les résultats de PCR quantitative intéressent aussi bien la protéine CARP endogène que la protéine CARP-V5 surexprimée. Nos résultats indiquent que, dans cette expérience, la protéine CARP-V5 est bien détectée dans les extraits surexprimant CARP (*figure 15A, à gauche*) et que le niveau d'expression de CARP (endogène et exogène) mesuré dans ces échantillons est de 1,5 fois supérieur à celui observé dans les extraits témoins (*figure 15A, à droite*).

Lors de l'analyse de nos résultats, nous avons choisi de ne considérer que les gènes dont l'expression varie au minimum d'un facteur de 1,5 dans les extraits d'intérêt par rapport aux extraits témoins.

Parmi les 45000 séquences testées dans cette expérience, 42 gènes sont régulés en présence de CARP (figure 15B) : 39 sont régulés négativement et 3 sont régulés positivement.

Etonnamment, nous avons retrouvé parmi les gènes régulés négativement, le gène *Ankrd1*, c'est-à-dire celui codant la protéine CARP. La sonde utilisée lors de cette expérience s'hybridant avec la région 3' UTR de l'ARNm de CARP -absente dans la construction CARP-V5 utilisée pour la surexpression-, nous pouvons affirmer que ce résultat ne concerne que la protéine CARP endogène. La surexpression efficace de CARP dans ces extraits semble donc inhiber la transcription de CARP endogène, suggérant l'existence d'une boucle d'autorégulation partielle de cette protéine (figure 15B), ce qui pourrait d'ailleurs expliquer le faible niveau de surexpression total dans nos échantillons.

Globalement, cette étude a permis de mettre en évidence que la présence de CARP modifie l'expression d'un certain nombre de gènes. Les protéines codées par ces gènes peuvent être classées par fonctions ou voies biologiques. Ainsi l'analyse de nos résultats à l'aide du logiciel *PANTHER* (Protein Analysis THrough Evolutionary Relationships) (<http://www.pantherdb.org/>) indique que les gènes dont l'expression varie en présence de CARP appartiennent à différentes catégories de fonction moléculaire. Les classes les plus représentées sont constituées par des gènes codant des protéines capables de lier des acides nucléiques, ou codant des facteurs de transcription, des récepteurs, des protéines régulatrices ou encore des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (figure 15C a). Ces différentes protéines -et potentiellement CARP par voie de conséquence- participeraient à des processus physiologiques variés tels que le métabolisme des protéines et des acides nucléiques, la transduction de signaux, le développement, le trafic intracellulaire, ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaire (figure 15C b).

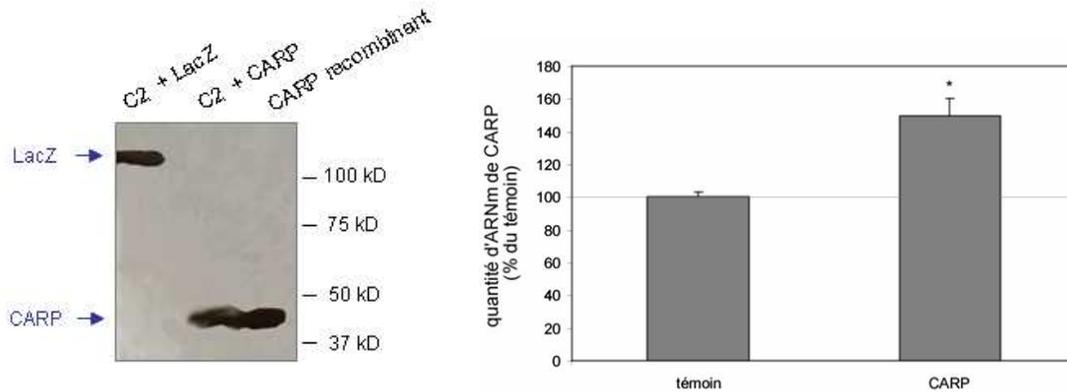
Nous avons souhaité comparer la répartition des gènes régulés en présence de CARP avec la répartition « normale » des protéines du muscle. Dans ce but, nous avons utilisé les données d'une banque de résultats obtenus par la méthode Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/AbsLL?FORMAT=text&LID=142&MIN=0&MAX=0&ORG=Hs&METHOD=SS10>) à partir de biopsies humaines. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la fréquence des gènes codant des protéines classées dans la catégorie des facteurs de transcription est nettement supérieure à la fréquence d'expression observée normalement dans le muscle pour cette classe de molécules (figure 15D, en haut). De même, nous avons montré que les gènes dont l'expression augmente particulièrement en présence de CARP sont impliqués dans les processus biologiques du métabolisme des acides nucléiques, du développement, de la transduction de signaux et de l'adhésion (figure 15D, en bas).

Par ailleurs, un croisement de l'ensemble des résultats obtenus pour les puces avec les 6 facteurs de transcription identifiés précédemment par notre étude a été effectué à l'aide du logiciel *Ingenuity* (<http://www.ingenuity.com/>) qui propose une classification des protéines par voies de signalisation cellulaire : aucun des gènes identifiés n'est connu pour être impliqué dans des voies régulées par les facteurs de transcription ciblés par CARP.

Toutefois, dans la littérature, certains des gènes identifiés ici sont décrits pour intervenir en amont ou en aval des facteurs de transcription FoxO, NF- κ B et SMAD4. Citons pour exemples la Nucléoporine 214 (*Nup214*), la Culline 3 (*Cul3*) et Del τ a-like 1 (*Dil1*) -un ligand de la protéine Notch- qui participent à la régulation de l'activité de NF- κ B (Abdallah *et al.*, 2007; Strack *et al.*, 2000; Xylourgidis *et al.*, 2006), tandis que la Vascular cell adhesion molecule 1 (*Vcam-1*) est sous sa dépendance (Schmid *et al.*, 2006) et que le facteur de transcription Chicken Ovalbumin Upstream Promoter II (COUP-TFII, appelé aussi NR2F2)

s'oppose à ses effets (Hou *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003). D'autre part, une corrélation a été proposée entre la phosphorylation de FoxO1 et l'expression de Smad4 et Bcl-2 (Kim *et al.*, 2007). Enfin, il a été récemment suggéré que FoxO1 et Notch coopéreraient pour réguler la différenciation musculaire et le type de fibres (Kitamura *et al.*, 2007).

A Vérification de la surexpression de CARP dans les cellules C2



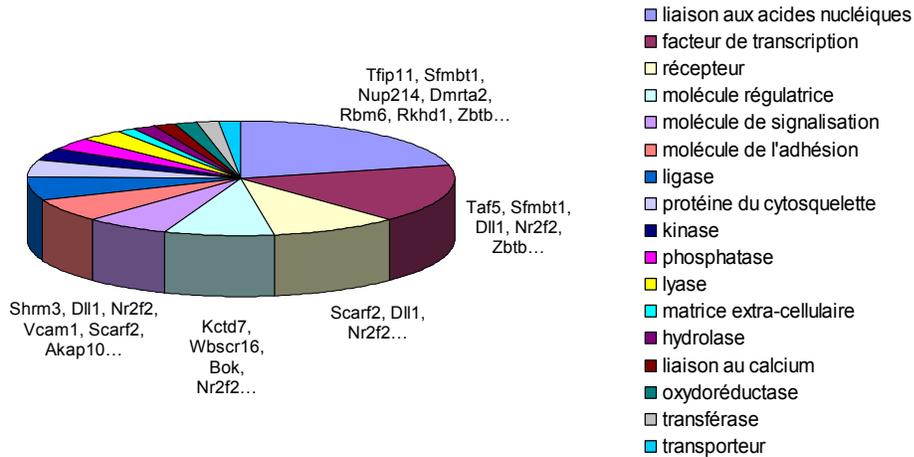
B Gènes régulés en présence de CARP

Symbole du gène	Nom du gène	Référence Unigene	valeur de p	Régulation
Bmper	BMP-binding endothelial regulator	Mm.335020	0,041094	/2,35
Wbscr16	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16 homolog (human)	Mm.29508	0,036783	/2,03
9130023D20Rik	Amino acid transporter	Mm.259799	0,008417	/2,03
A630052C17Rik	RIKEN cDNA A630052C17 gene	Mm.347738	0,028273	/2,01
Ankrd1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	Mm.10279	0,007581	/1,97
D15Wsu169e	DNA segment, Chr 15, Wayne State University 169, expressed	Mm.322931	0,040797	/1,96
Nr2f2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	Mm.270109	0,011465	/1,92
C230098O21Rik	RIKEN cDNA C230098O21 gene	Mm.40303	0,020786	/1,91
1110028F18Rik	RIKEN cDNA 1110028F18 gene	Mm.57702	0,000397	/1,90
Tmem164	transmembrane protein 164	Mm.328361	0,026640	/1,89
Cd24a	CD24a antigen	Mm.29742	0,000369	/1,82
Gsta2	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	Mm.371562	0,044252	/1,81
2310050B05Rik	RIKEN cDNA 2310050B05 gene	Mm.265218	0,017879	/1,81
Igtp	interferon gamma induced GTPase	Mm.33902	0,016253	/1,76
Kctd7	potassium channel tetramerisation domain containing 7	Mm.55812	0,006725	/1,72
Shrm3	shroom family member 3	Mm.46014	0,003660	/1,71
Ccdc123	coiled-coil domain containing 123	Mm.133263	0,040427	/1,69
Foxred2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2	Mm.295605	0,011448	/1,68
Cnm2	cyclin M2	Mm.306903	0,038790	/1,68
Zbtb	zinc finger and BTB domain containing	Mm.370295	0,001161	/1,67
Akap10	A kinase (PRKA) anchor protein 10	Mm.274404	0,035645	/1,66
Scarf2	scavenger receptor class F, member 2	Mm.194950	0,042208	/1,66
Nr2f2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	Mm.270109	0,016285	/1,65
Pigl	Phosphatidylinositol glycan, class L	Mm.371725	0,046686	/1,65
5330406M23Rik	RIKEN cDNA 5330406M23 gene	Mm.109877	0,036372	/1,63
Dennd4b	DENN/MADD domain containing 4B	Mm.30571	0,001138	/1,63
3110004L20Rik	Solute carrier family 22 member 17	Mm.23932	0,017841	/1,63
Dll1	delta-like 1 (Drosophila)	Mm.4875	0,013627	/1,62
Sfrnb1	Scrn-like with four mbt domains 1	Mm.294662	0,007498	/1,59
Rbm6	RNA binding motif protein 6	Mm.139926	0,025545	/1,56
Mast4	microtubule associated serine/threonine kinase family member 4	Mm.202606	0,035471	/1,56
Sgpl1	sphingosine phosphate lyase 1	Mm.200373	0,039868	/1,55
Tfip11	tufelin interacting protein 11	Mm.172947	0,006929	/1,55
Synj1	synaptojanin 1	Mm.187079	0,024211	/1,54
Nup214	nucleoporin 214	Mm.289686	0,044029	/1,53
Rkhd1	ring finger (C3HC4 type) and KH domain containing 1	Mm.268389	0,006698	/1,53
Dmrt2	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A2	Mm.32825	0,024642	/1,52
Bok	Bcl-2-related ovarian killer protein	Mm.3295	0,008526	/1,50
Neurl	neuronal-like homolog (Drosophila)	Mm.313651	0,000952	/1,50
Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	Mm.76649	0,019675	x 1,66
Cul3	Cullin 3	Mm.12665	0,025865	x 1,54
Taf5	TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	Mm.301522	0,028276	x 1,54

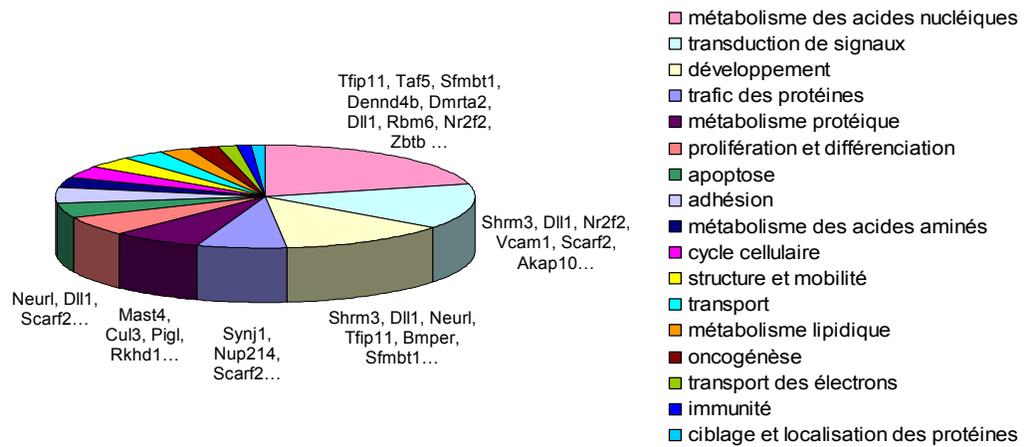
régulation négative
régulation positive

C Classification des principaux gènes régulés en présence de CARP

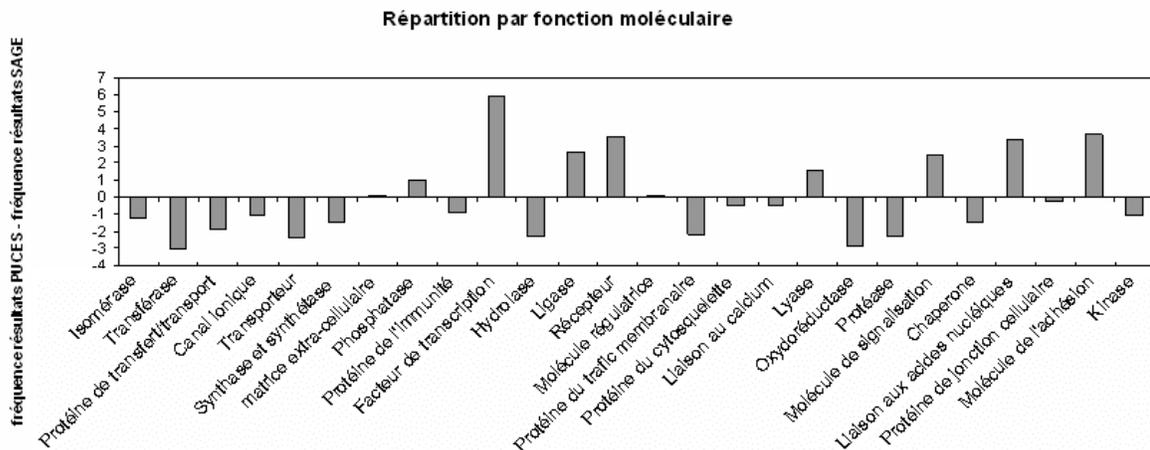
a/ Répartition par fonctions moléculaires



b/ Répartition par processus biologiques



D Différences de répartition des gènes régulés en présence de CARP par rapport à la répartition des protéines du muscle



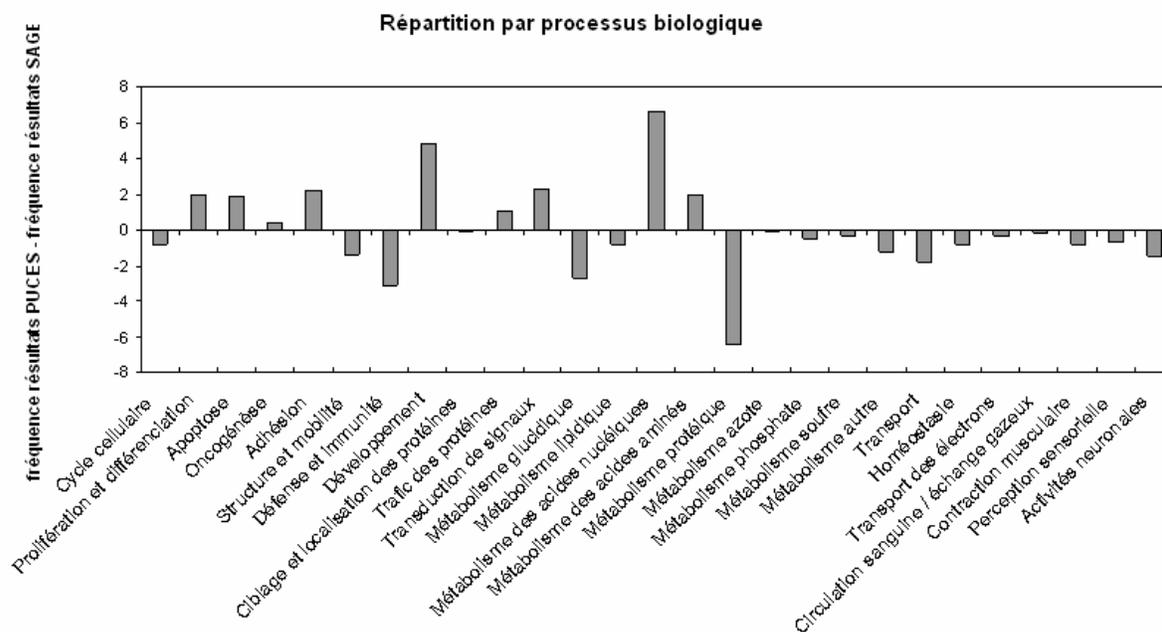


Figure 15 : La surexpression de CARP a un effet sur la régulation de différents gènes

Comparaison des transcriptomes des cellules C2 transfectées par le plasmide pcDNA3-CARP-V5 et transfectées par le plasmide témoin pcDNA3-LacZ-V5. **A/** Vérification de la surexpression de CARP et de LacZ dans les extraits d'intérêt en western-blot par hybridation avec un anticorps anti-V5 (le témoin positif correspond à la protéine CARP recombinante et portant l'étiquette V5) (à gauche) et par PCRQ où l'expression de CARP est normalisée par rapport à celle du gène PO et les résultats exprimés en pourcentage de l'expression mesurée dans les extraits témoins (à droite). **B/** Résultats obtenus par la technique des puces à ADN (*Affymetrix*) indiquant les gènes dont le niveau d'expression est significativement diminué ou augmenté d'au moins 1,5 fois en présence de CARP. La valeur p représente la significativité des résultats. n = 2. **C/** Classification des principaux gènes régulés en présence de CARP par fonctions moléculaires (a) ou processus biologiques (b). **D/** Comparaison de la fréquence des catégories de gènes régulés en présence de CARP avec la fréquence d'expression de ces mêmes catégories dans le muscle squelettique (données issues d'une banque de résultats de SAGE obtenus pour le muscle humain *vastus lateralis*).

De façon très intéressante, dans les conditions de notre étude du transcriptome, 3 gènes seulement sont soumis à une régulation positive après surexpression de CARP. L'un d'entre eux a particulièrement attiré notre attention : le gène *Cul3*. La culline 3 est une sous-unité d'un membre de la famille des ubiquitine-ligases E3. CARP pourrait donc participer à la dégradation des protéines en stimulant l'expression de *Cul3*. Nous avons donc vérifié ce résultat par RT-PCR quantitative (*fiche technique n°8*) et avons constaté que le profil d'expression de *Cul3* suivait celui de CARP (*figure 16*).

De la même façon, nous avons souhaité vérifier certains des résultats obtenus par la technique des puces à ADN. Nous avons mesuré par RT-PCR quantitative (*fiche technique n°8*) dans les extraits cellulaires surexprimant CARP, le niveau d'expression de plusieurs gènes identifiés comme cibles potentielles de CARP. Nous avons pu confirmer que la présence de CARP stimule l'expression de *Vcam1* et inhibe celle de *Neuralized-like* (*Neurl*) et de la *Glutathione S-Transférase alpha 2* (*GSTa2*). Nous n'avons cependant pas validé les résultats obtenus pour *Dll1*, *Kctd7* et *NR2F2* (*figure 16*).

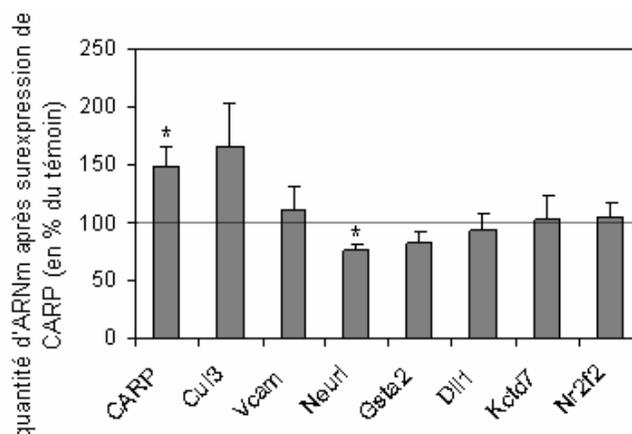


Figure 16 : La surexpression de CARP stimule la transcription de Cul3 et Vcam1 et inhibe celle de Neurl et GSTa2

L'expression de CARP, Cul3, Vcam1, Neurl, GSTa2, Dll1, Kctd7 et NR2F2 est quantifiée par PCR quantitative et normalisée par rapport à celle du gène PO dans des cellules surexprimant CARP. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'expression mesurée dans les extraits témoins (surexprimant LacZ). n = 3 * p < 0,05

La stratégie de surexpression dans des cellules musculaires nous a permis d'identifier un grand nombre de cibles potentielles de la protéine CARP. D'autre part, nous avons mis en évidence que ce facteur exerce sa fonction de régulateur de la transcription en modulant notamment les activités des facteurs NF- κ B p65 et FoxO1.

2.2.2 Recherche des partenaires de CARP dans le muscle squelettique

2.2.2.1 Identification de partenaires potentiels par le système de double-hybride

Une autre approche utilisée pour caractériser la fonction de CARP a été de rechercher ses partenaires dans le muscle squelettique. Pour cela, nous avons bénéficié d'un projet d'interactome musculaire à large échelle impliquant notre laboratoire et la société *Hybrigenics* (*fiche technique n°4*). Le but de cette étude est de faciliter la compréhension de la fonction de certaines protéines, notamment celles qui sont impliquées dans des myopathies et par conséquent d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques pour les dystrophies musculaires.

Nous avons recherché, dans une banque d'ADNc comportant 10 millions de clones indépendants extraits de muscles humains adultes et fœtaux, les partenaires potentiels (ou « proies ») de CARP (appelé ici l'« appât ») dans le muscle squelettique. D'autre part, nous l'avons également retrouvé comme proie lors de criblages faisant intervenir d'autres protéines « appâts ». L'ensemble de ces résultats nous a permis d'établir un réseau de partenaires de CARP (*figure 17*).

Il est cependant nécessaire de préciser qu'une telle méthode peut générer des résultats faux-positifs. Ils sont principalement dus à une fixation aléatoire de la proie sur le promoteur histidine ou à des interactions aberrantes causées par des protéines de la levure. De plus, certaines interactions demeurent difficilement détectables ou n'existent pas chez la levure. Elles génèrent des résultats faux-négatifs qui sont dus notamment à une conformation inadéquate des protéines, à l'absence de translocation nucléaire de l'une ou l'autre des protéines, à l'impossibilité de subir des modifications post-traductionnelles dans la levure et à la limitation des conditions du test à une situation physiologique unique.

Un score de fiabilité a été attribué à chaque interaction détectée, en prenant en considération entre autre le nombre de clones retrouvés dans ce criblage. Ainsi, les scores A, B et C désignent les interactions les plus probables. Le score D est attribué lorsqu'un seul clone est retrouvé. Il peut alors s'agir d'un faux positif ou d'une protéine faiblement exprimée. Les protéines hautement connectées (retrouvées dans de nombreux criblages) font l'objet d'une catégorie particulière (score E). Ce sont soit des protéines dites « collantes », soit des protéines impliquées dans de nombreuses voies biologiques (figure 17).

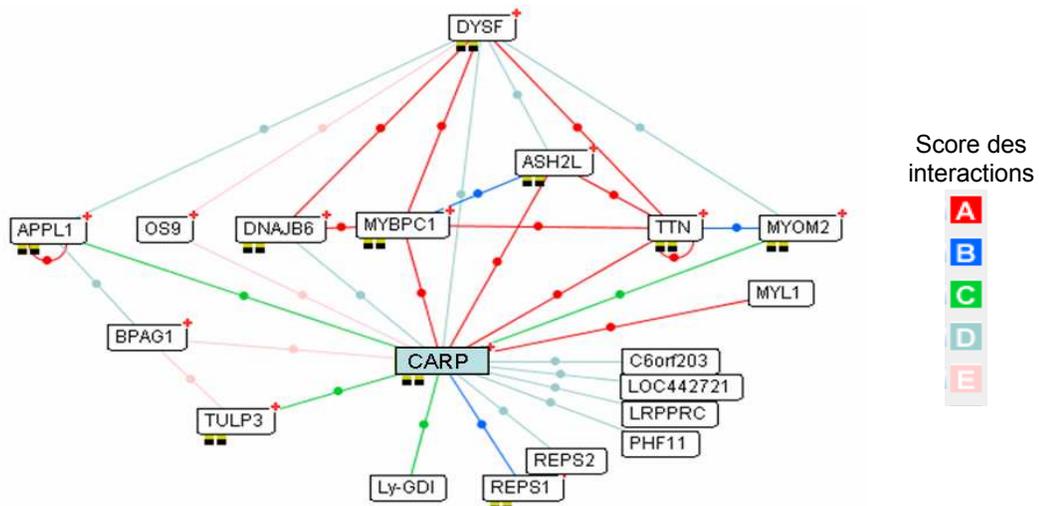


Figure 17 : CARP possède de nombreux partenaires potentiels dans le muscle squelettique

Réseau protéique hypothétique constitué par CARP et ses partenaires identifiés par double-hybride. Les scores attribués à chacune des interactions sont représentés par un code de couleurs indiqué à droite.

Parmi les partenaires potentiels de CARP, les protéines absent, small or homeotic-like 2 (ash2l), MYosin Binding Protein C, slow type (MYBPC1), MYosin Light polypeptide 1 (MYL1) et titine représentent les résultats les plus fiables (scores A). De même, les protéines RalPB 1 associated EPS domain containing 1 (REPS1) (score B), Adaptator Protein containing pH domain, PTB domain and Leucine zipper motif 1 (APPL1), Rho GDP-Dissociation Inhibitor (RhoGDI ou Ly-GDI), MYOMesin 2 (MYOM2) et TUbbly Like Protein 3 (TULP3) (scores C) font également partie des résultats les plus significatifs. Bien que de score D, REPS2 et la dysferline sont également des partenaires d'intérêt potentiel, le premier en raison de la découverte d'une autre isoforme de score plus élevé dans le même criblage (REPS1, score B) et le second puisqu'une déficience en dysferline conduit à un phénotype de LGMD (figure 17).

2.2.2.2 Confirmation des résultats

En raison de l'existence de faux positifs et de faux négatifs évoqués précédemment, il est indispensable de valider l'ensemble de ces résultats dans des cellules mammifères par d'autres méthodes. Certaines interactions particulièrement intéressantes ont donc été vérifiées par des méthodes de co-immunopurification.

Un des partenaires potentiels de CARP, la protéine RhoGDI, participe à la régulation de la différenciation myogénique en inhibant la voie de signalisation des protéines de la famille RhoG (Shisheva *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 1998). La démonstration de l'existence physiologique de l'interaction entre CARP et

RhoGDI suggérerait donc un rôle de CARP dans ce processus. Cette interaction a été testée dans des cellules C2 différenciées surexprimant la protéine de fusion CARP-V5. Après extraction des protéines, CARP a été immunoprécipité à l'aide de billes de protéineG-sépharose couplées à l'anticorps anti-V5 et l'analyse a été réalisée par western blot (*fiches techniques n°2 et 3*).

L'efficacité de l'immunoprécipitation a été vérifiée en hybridant la membrane avec l'anticorps anti-V5, révélant une bande à la taille attendue pour CARP (43kDa) dans la fraction précipitée (*figure 18A, hybridation anti-V5*). RhoGDI endogène a été détecté à l'aide d'un anticorps spécifique : la protéine est trouvée à la taille attendue (27kDa) au niveau des extraits protéiques totaux et des surnageants, mais est complètement absente du culot (*figure 18A, hybridation anti-RhoGDI*). Cette protéine n'a donc pas été précipitée avec CARP, suggérant que l'interaction entre les deux protéines n'existe pas dans les conditions de notre expérience.

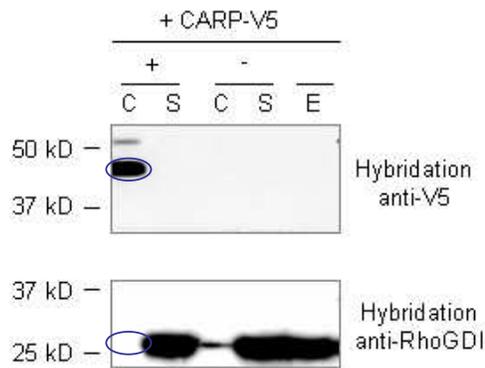
Deux autres partenaires potentiels de CARP ont suscité notre intérêt. Les protéines REPS1 et REPS2 sont connues pour stimuler la voie de signalisation Ral impliquée dans le développement de mécanismes atrophiques (Essers *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 1998; Penninkhof *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2001). Afin de tester la fonction de l'association de CARP avec REPS1 et/ou REPS2 dans la régulation de la masse musculaire, leur interaction a été testée par immunoprécipitation. Ne disposant pas d'anticorps pour ces protéines au moment de l'analyse, les ADNc de REPS1 et REPS2 ont préalablement été clonés dans les plasmides pcDNA3-REPS1-V5 et pcDNA-REPS2-V5 ; l'ADNc de CARP a été cloné dans le plasmide pSMD2-CARP-GST (*fiche technique n°1*). Après surexpression dans des cellules C2 différenciées, les protéines de fusion REPS1-V5 et REPS2-V5 ont été extraites et immunoprécipitées selon la même méthode que précédemment (*fiches techniques n°2 et 3*).

Dans le cas de l'immunoprécipitation de REPS1-V5, une bande correspondant à REPS1 (85 kDa) est détectée par l'anticorps dirigé contre l'épitope V5 dans le culot, attestant de la réussite de la purification (*figure 18B à gauche, hybridation anti-V5*). L'hybridation de la membrane avec l'anticorps anti-GST présente une bande à 62 kDa dans le culot, indiquant que CARP a été précipité avec REPS1 : CARP et REPS1 interagissent donc dans nos conditions expérimentales (*figure 18B à gauche, hybridation anti-GST*).

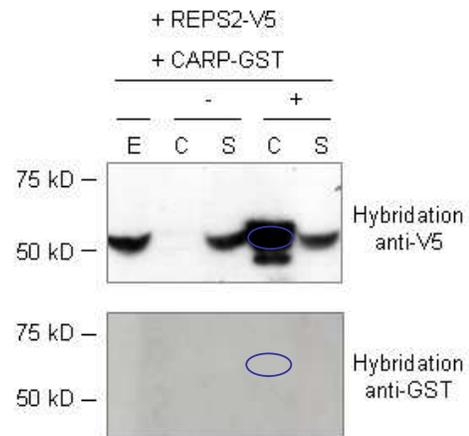
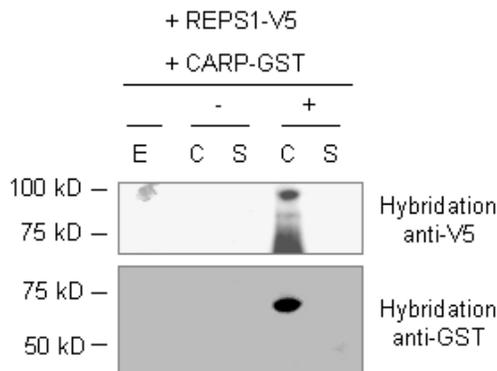
Bien que l'immunoprécipitation de REPS2-V5 ait aussi fonctionné (une bande correspondant à REPS2 est détectée à 62kDa dans le culot lors de l'hybridation anti-V5) (*figure 18B à droite*), CARP n'est détecté lors de l'hybridation anti-GST ni dans le surnageant, ni dans le culot obtenus, suggérant que dans ce cas, l'expression de CARP a été inefficace (*figure 18B à droite, hybridation anti-GST*). Une purification de la protéine CARP a été réalisée par chromatographie d'affinité pour la GST (*fiche technique n°3*) à partir des extraits protéiques issus des cellules co-exprimant REPS2-V5 et CARP-GST.

Dans nos conditions expérimentales, la protéine CARP est purifiée efficacement à l'aide des billes de Glutathione-séparose (détection à 62kDa -poids moléculaire de CARP portant l'étiquette GST- dans le culot) (*figure 18C, hybridation anti-GST*). Une bande à 62 kDa est révélée au niveau du culot par marquage avec l'anticorps V5, démontrant que REPS2 a été co-purifié avec la protéine CARP (*figure 18C, hybridation anti-V5*). L'ensemble de ces expériences démontre donc que CARP est capable d'interagir avec REPS1 et REPS2.

A Immunoprécipitation de CARP et vérification de son interaction avec RhoGDI



B Immunoprécipitations de REPS1 et de REPS2



C Purification de CARP par chromatographie d'affinité

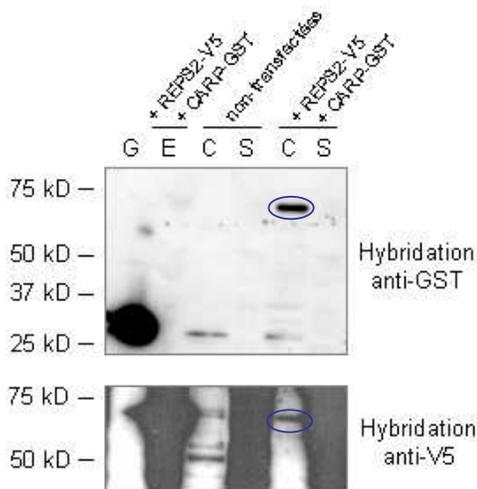


Figure 18 : REPS1 et REPS2 interagissent avec CARP

A/ Après surexpression dans des cellules C2 différenciées, la protéine de fusion CARP-V5 est immunoprécipitée par un anticorps anti-épitope V5. L'hybridation avec un anticorps dirigé spécifiquement contre RhoGDI ne permet pas de confirmer l'interaction entre CARP et RhoGDI dans cette condition. (E : extrait protéique total, C : culot, S : surnageant, + : immunoprécipitation réalisée avec les billes et l'anticorps, - : immunoprécipitation réalisée avec les billes seules) **B/** Après surexpression de différentes protéines de fusion (CARP-GST, REPS1-V5 et REPS2-V5) dans des cellules C2 différenciées, les protéines REPS1 et REPS2 sont immunoprécipitées par un anticorps anti-épitope V5. L'hybridation avec un anticorps anti-GST permet de mettre en évidence une interaction entre CARP et REPS1, mais pas entre CARP et REPS2 dans cette expérience. (E : extrait protéique total, C : culot, S : surnageant, + : immunoprécipitation réalisée avec les billes et l'anticorps, - : immunoprécipitation réalisée avec les billes seules) **C/** Après surexpression des protéines de fusion CARP-V5 dans des cellules C2 différenciées, la protéine CARP est purifiée par chromatographie d'affinité pour la GST. L'hybridation avec un anticorps anti-épitope V5 permet de confirmer l'interaction de CARP avec REPS2. (E : extrait protéique total, C : culot, S : surnageant, G : protéine G)

2.3 Conclusion

Dans le muscle squelettique, CARP est localisé au niveau des sarcomères des fibres et à l'intérieur des noyaux. Comme dans le cœur, CARP est capable de réguler dans ce tissu l'activité de liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, NF- κ B p65 et FoxO1 sont connus pour favoriser l'expression de protéines régulant positivement les mécanismes d'atrophie. Dans notre étude, nous démontrons également que CARP contrôle l'expression de nombreux gènes, parmi lesquels le gène codant la culline 3, sous-unité du protéasome impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. D'autre part, CARP peut s'associer avec différentes isoformes de la famille des REPS, protéines intermédiaires dans une voie de signalisation contrôlant la masse musculaire.

L'ensemble de nos résultats souligne l'importance de la protéine CARP dans le muscle squelettique puisqu'elle semble intervenir dans diverses voies biologiques. Considérant l'existence d'une relation fonctionnelle entre CARP et la calpaïne 3, les mécanismes par lesquels CARP pourrait être impliqué dans la régulation de la masse musculaire et de la prolifération cellulaire suscitent particulièrement notre intérêt. Toutefois, l'élucidation du rôle précis de CARP dans ces processus nécessite encore de nombreuses confirmations et des analyses supplémentaires, notamment *in vivo*, dont certaines sont actuellement en cours dans notre laboratoire.

3 CARP dans la physiopathologie musculaire

3.1 Contexte

Une littérature abondante montre que l'expression du facteur CARP est perturbée lors de nombreuses pathologies musculaires, notamment lorsqu'elles sont associées à des variations de la masse du tissu. En effet, une surexpression de CARP a été observée dans le muscle squelettique lors de l'atrophie provoquée par une dénervation (Baumeister *et al.*, 1997) et dans le cas de nombreuses pathologies caractérisées par une atrophie musculaire comme la dystrophie musculaire de Duchenne (Bakay *et al.*, 2002), la dystrophie des ceintures de type 2B (Suzuki *et al.*, 2005; Wenzel *et al.*, 2007), la myopathie congénitale et l'atrophie musculaire spinale (Nakada *et al.*, 2003a; Nakada *et al.*, 2003b) et bien d'autres encore (Nakamura *et al.*, 2002), ainsi que chez un modèle murin de dystrophie musculaire (mdm) (Witt *et al.*, 2004).

De même, dans le cœur, l'expression de CARP est augmentée dans des pathologies musculaires : chez des modèles murins de cardiomyopathie dilatée et d'infarctus du myocarde (Arber *et al.*, 1997) ; lors de l'infarctus du myocarde humain (Zolk *et al.*, 2002) ; ou encore chez des patients atteints de cardiomyopathie dilatée (Nagueh *et al.*, 2004).

De nombreux éléments plaident en faveur d'une participation de CARP dans les mécanismes physiopathologiques, soit comme facteur aggravant, soit comme facteur compensatoire. Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'expression de CARP dans les muscles de modèles murins présentant une dystrophie ou une atrophie musculaire. D'autre part, nous avons souhaité documenter les effets de la surexpression de CARP dans les muscles de souris.

3.2 Résultats

3.2.1 *Expression de CARP dans les muscles de modèles animaux*

3.2.1.1 **Modèles de dystrophies musculaires**

Nous avons examiné le niveau d'expression de CARP dans les muscles de modèles murins de dystrophies musculaires. Dans la littérature, il a préalablement été rapporté que l'augmentation de l'expression de CARP pouvait être associée à une régulation positive de la protéine p21^{WAF1/CTP1}, un inhibiteur du cycle cellulaire (Kanai *et al.*, 2001). Nous avons donc inclus dans notre étude, la quantification de l'expression de cette cible potentielle de CARP. Nous avons aussi étudié l'expression des facteurs de transcription des familles NF- κ B et FoxO dans ces modèles puisque d'une part, nous avons montré précédemment que CARP pouvait réguler leurs activités et que d'autre part, ils sont décrits pour être impliqués dans des processus d'atrophie. Enfin, nous nous sommes également intéressés à l'expression des atrogènes classiques MuRF1 et MAFbx, deux protéines connues pour être notamment sous la dépendance des facteurs NF- κ B et FoxO.

Nous avons quantifié, par PCR quantitative en temps réel (amorces de PCR et méthodologie en annexe : *fiche technique n°8*), l'expression des gènes codant CARP, p21^{WAF1/CTP1}, NF- κ B p65, FoxO1, MuRF1 et MAFbx dans des extraits musculaires issus de 4 modèles murins différents : la souris *C3-null* déficiente en calpaïne 3 (modèle LGMD2A), la souris B6.A/J.dysf^{prmd} (BlaJ) déficiente en dysferline (modèle LGMD2B) (Ho *et al.*, 2004), la souris *Sgca-null* déficiente en α -sarcoglycane (modèle LGMD2D) (Duclos *et*

al., 1998) et la souris *mdx*^{4Cv} déficiente en dystrophine (modèle de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)) (Chapman *et al.*, 1989) (*fiche technique n°6*). Les animaux ont été étudiés à un âge où les symptômes de la maladie sont bien développés (4 mois pour chaque modèle excepté les souris *C3-null* âgées de 7 mois).

Différents types de muscles [(T)ibialis Antérieur (TA), (E)xtensorum (D)igitorum (L)ongus (EDL), soleus, psoas et quadriceps]) ont été prélevés pour l'analyse, pour des raisons variées: (i) leur composition différente en types de fibres : l'EDL et le TA sont majoritairement composés de fibres rapides, le soleus est composé exclusivement de fibres lentes, le psoas ne contient que des fibres rapides tandis que le quadriceps est un muscle mixte ; (ii) leur atteinte spécifique ou leur non-atteinte dans certains des modèles dystrophiques étudiés : chez les animaux *C3-null*, les soleus et psoas présentent de nombreux signes dystrophiques, les TA et EDL sont faiblement atteints par la maladie et le quadriceps n'est pas touché (données non-publiées); dans le cas du modèle B6.A/J.dys^{prmd}, le quadriceps est très atteint, le TA et le soleus le sont moyennement (les autres muscles étudiés ici ne sont pas documentés) (Ho *et al.*, 2004) ; enfin, tous les muscles des modèles *Sgca-null* et *mdx*^{4Cv} sont sévèrement atteints (Chapman *et al.*, 1989; Duclos *et al.*, 1998).

Comme le montrent les résultats de notre analyse, l'expression de CARP est significativement augmentée dans les soleus et psoas (muscles très atteints) de la souris *C3-null* par rapport à l'expression chez l'animal témoin (souris 129SvPasIco) (*figure 19A*). En ce qui concerne les muscles des animaux *Sgca-null*, CARP est plus fortement exprimé dans presque tous les muscles étudiés. Dans le cas du psoas, l'augmentation du niveau de CARP peut même atteindre jusqu'à 47 fois le niveau observé chez les témoins (C57Bl/6). Enfin, dans le cas de la souris *mdx*^{4Cv}, tous les muscles étudiés ici montrent une expression accrue de la protéine. L'expression de CARP est donc systématiquement augmentée dans ces trois modèles. Nos résultats montrent également une stimulation de p21^{WAF1/CTP1} dans les muscles de ces modèles à l'exception du modèle B6.A/J.dys^{prmd}, pour lequel l'expression de CARP ne semble pas varier (*figure 19B*).

Dans notre expérience, l'expression de FoxO1 est significativement augmentée dans tous les muscles de souris *C3-null* (par rapport à son expression dans les mêmes muscles de souris témoins), alors qu'elle est plutôt diminuée dans les autres modèles (*figure 19C*). Ces résultats suggèrent que la stimulation de FoxO1 ne serait pas liée au degré d'atteinte du muscle, ni à sa composition en types de fibres, mais plutôt à l'absence de calpaïne 3. Quant au facteur NF-κB p65, il est globalement stimulé dans tous les modèles considérés à l'exception de la souris B6.A/J.dys^{prmd} (*figure 19D*).

En ce qui concerne les ubiquitine-ligases E3 MuRF1 et MAFbx, leur expression ne semble pas être liée, dans ces conditions, à celle des facteurs précédents. La quantité d'ARNm de MuRF1 augmente significativement dans des muscles présentant de nombreux signes dystrophiques pour les modèles *C3-null* (soleus) tandis qu'elle diminue dans le quadriceps très atteint des modèles *Sgca-null* et *mdx*^{4Cv} (*figure 19E*). L'expression de MAFbx est diminuée dans presque tous les muscles de chacun des modèles étudiés à l'exception de la souris B6.A/J.dys^{prmd} (*figure 19F*). La régulation de l'expression de ces gènes semble donc varier en fonction des muscles étudiés et des modèles considérés.

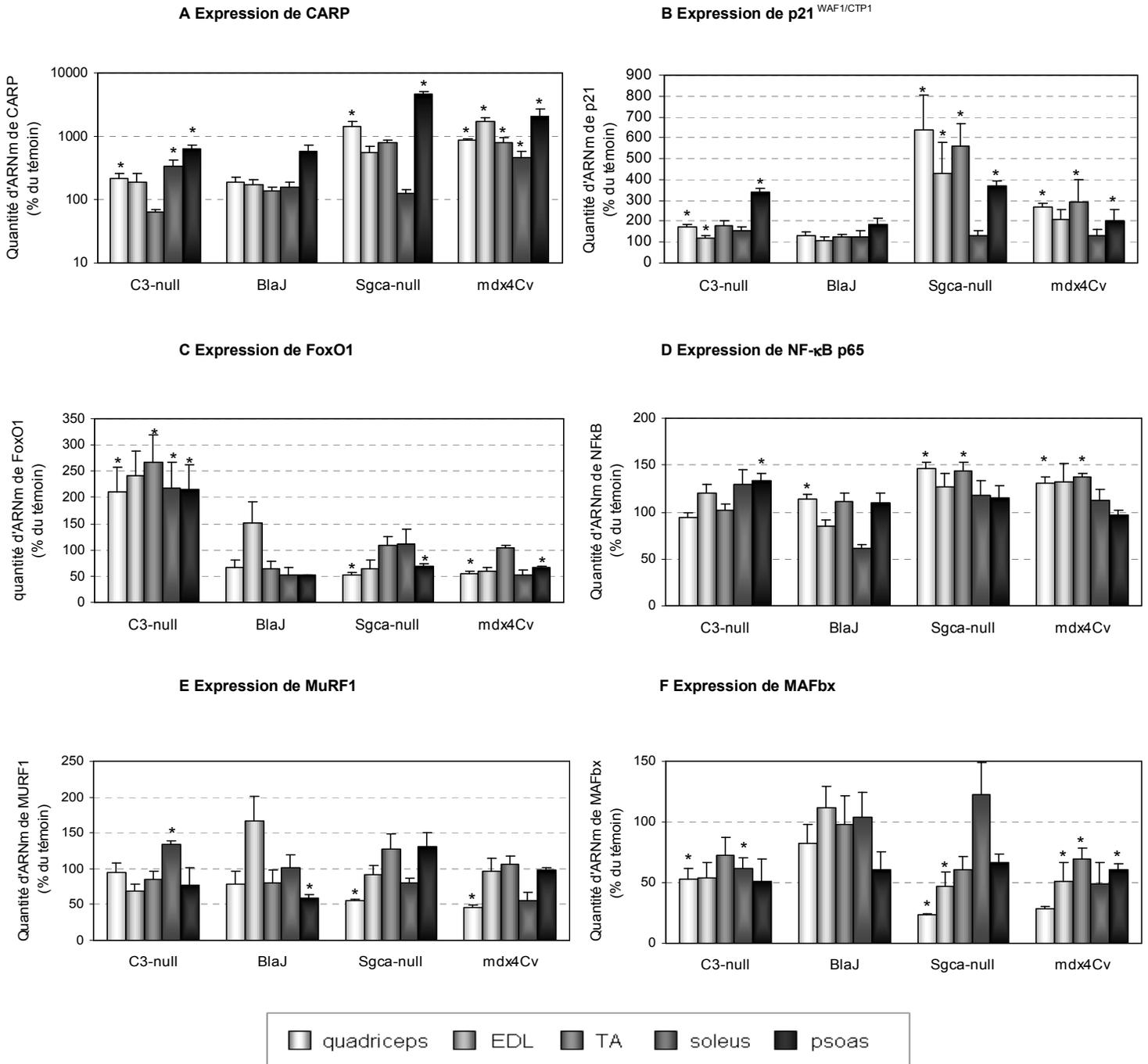


Figure 19 : l'expression de la protéine CARP est systématiquement augmentée dans les muscles de différents modèles animaux de dystrophies musculaires

Pour chacun des modèles (*C3-null*, *B6.A/J.dysf^{prmd}* (BlaJ), *Sgca-null* et *mdx^{4Cv}*) l'expression des gènes CARP (A), p21^{WAF1/CTP1} (B), FoxO1 (C), NF-κB p65 (D), MuRF1 (E) et MAFbx (F), dans les muscles quadriceps, EDL, TA, soleus et psoas, est quantifiée par PCRQ et normalisée par rapport à l'expression de PO. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'expression mesurée dans les muscles de leurs témoins respectifs (129SvPaslco pour la souris *C3-null*, C57Bl/6 pour les autres). n = 4 ; * p<0,05

3.2.1.2 Modèles d'atrophie consécutive à une dénervation

Il est connu que la dénervation et l'immobilisation d'un membre sont des conditions qui permettent d'obtenir une perte de poids significative, en particulier une perte de tissu musculaire (Lindboe et Platou, 1984). De plus, ces phénomènes sont associés à la mise en place de processus de remodelage témoignant de la plasticité du muscle. Afin de préciser le rôle de CARP dans les mécanismes physiopathologiques évoqués précédemment, nous avons comparé le niveau d'expression de CARP au cours de l'atrophie induite par une dénervation définitive et au cours du remodelage lié à une atrophie transitoire. Comme précédemment, nous avons inclus dans notre analyse l'étude de l'expression des protéines p21^{WAF1/CTP1}, NF- κ B p65, FoxO1, MuRF1 et MAFbx dans ces conditions.

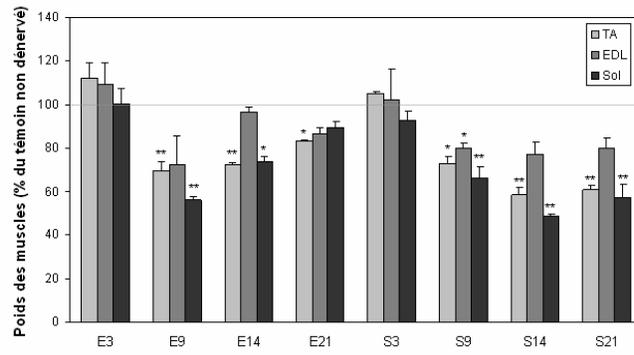
Nous avons fait subir à des souris sauvages la dénervation définitive ou transitoire d'un membre postérieur par section ou écrasement du nerf sciatique correspondant (*fiche technique n°6*). L'expérience a été réalisée sur un grand nombre d'animaux qui ont été sacrifiés 1 jour, 3 jours, 7 jours, 9 jours, 11 jours, 14 jours ou 21 jours après la dénervation. Les muscles TA, EDL et soleus ont été prélevés et pesés avant d'en extraire les ARN et les protéines pour des analyses plus précises.

D'après nos résultats, la plupart des muscles de la patte dénervée perdent jusqu'à 40% de leur masse 21 jours après la dénervation définitive (par rapport aux muscles d'animaux témoins n'ayant pas subi de dénervation). C'est le cas du TA notamment. Cette perte musculaire semble nécessiter plusieurs jours pour apparaître puisqu'après 3 jours, le poids des muscles n'est pas encore altéré. Par ailleurs, la mise en place de la ré-innervation consécutive à la dénervation transitoire permet une récupération progressive du poids normal des muscles. Ces données démontrent l'efficacité de nos conditions de dénervation pour induire les processus atrophiques désirés (*figure 20A*).

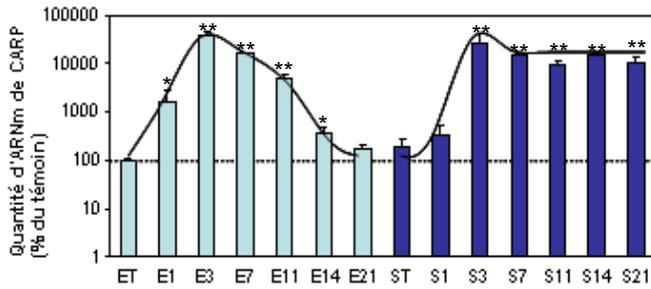
L'expression de CARP, p21^{WAF1/CTP1}, FoxO1, NF- κ B p65, MuRF1 et MAFbx a été quantifiée dans les extraits de TA par PCR quantitative en temps réel (*fiche technique n°8*). L'expression de CARP est fortement augmentée dès le troisième jour après dénervation, comme le montrent les niveaux d'ARN en fonction du temps écoulé après la dénervation (*figure 20B*). Tandis que son niveau diminue ensuite dès le septième jour après la dénervation transitoire, il reste très élevé au cours du temps dans le cas de la dénervation définitive. Ceci est d'ailleurs confirmé par son profil protéique en western-blot (*fiche technique n°3*) après 21 jours (*figure 20H*). D'autre part, comme il a été observé lors de l'étude des modèles murins de dystrophies musculaires, l'expression de p21^{WAF1/CTP1} semble suivre celle de CARP (*figure 20C*).

L'expression des protéines FoxO1, NF- κ B p65, MuRF1, et MAFbx est systématiquement stimulée dès le troisième jour après l'intervention (*figure 20D, 20E, 20F et 20G*) avant que la perte de poids ne soit observée. De plus, elle revient généralement à son niveau normal après 14 jours, quel que soit le mode de dénervation considéré, suggérant que la stimulation de toutes ces protéines ne soit nécessaire que lors des étapes précoces des mécanismes conduisant à l'atrophie.

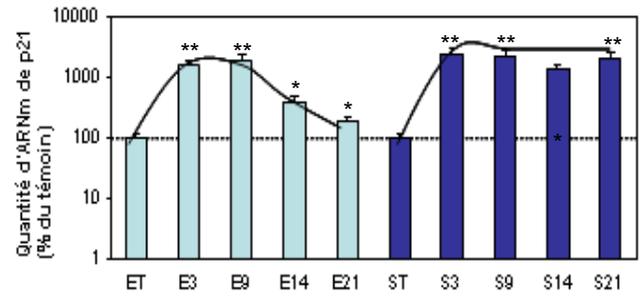
A Poids des muscles



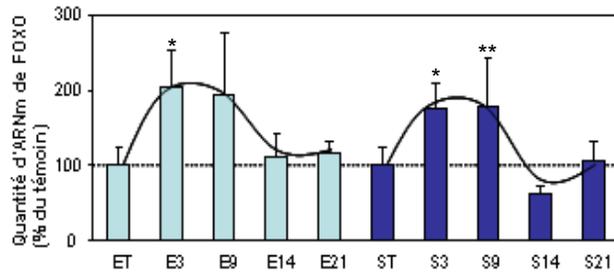
B Expression de CARP



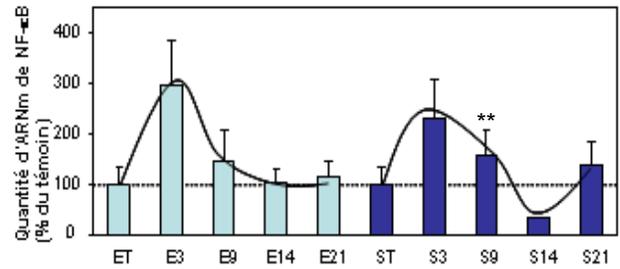
C Expression de p21^{WAF1/CTP1}



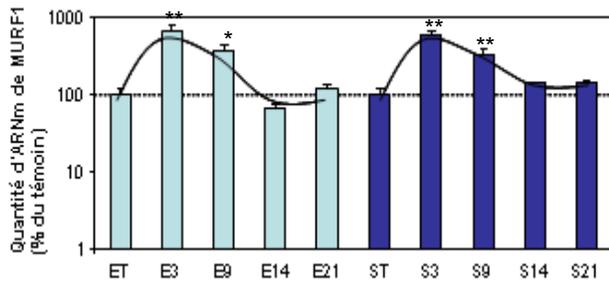
D Expression de FoxO1



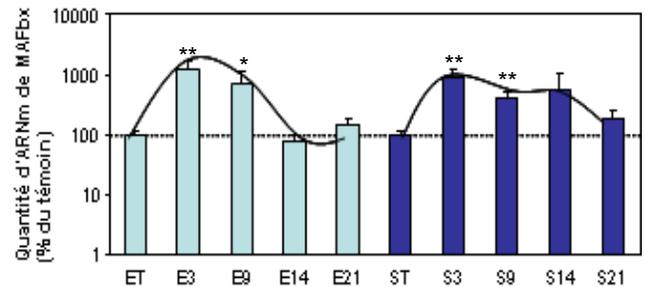
E Expression de NF-κB p65



F Expression de MuRF1



G Expression de MAFbx



H Western-blot (CARP)

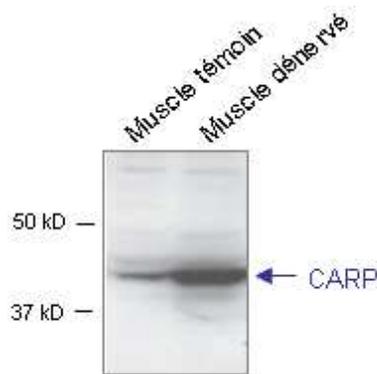


Figure 20 : L'expression de CARP augmente après dénervation

Des souris sauvages (129SvPaslco) sont soumises à une dénervation transitoire ou définitive du membre postérieur gauche par écrasement (E) ou section (S) du nerf sciatique. Plusieurs jours après l'intervention (1, 3, 7, 9, 11, 14 ou 21), les souris sont sacrifiées, les muscles sont prélevés et pesés et l'expression des gènes est quantifiée. **A/** Les poids des muscles (TA, EDL et soleus) après dénervation sont exprimés en pourcentage du poids des muscles témoins (non-dénervés). n = 3 ; ** p<0,01 ; * p<0,05. **B/ C/ D/ E/ F/ et G/** Les niveaux d'ARNm de CARP, p21^{WAF1/CTP1}, FoxO1, NF-κB p65, MuRF1 et MAFbx, sont mesurés dans les TA par PCRQ et normalisés par rapport à l'expression de PO. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'expression des gènes dans les muscles témoins (non-dénervés). n = 6 ; ** p<0,01 ; * p<0,05 **H/** Le profil de la protéine CARP après analyse par western-blot des extraits de TA (non dénervé et 21 jours après dénervation définitive) est révélé par hybridation avec l'anticorps anti-CARP dilué au 1:500.

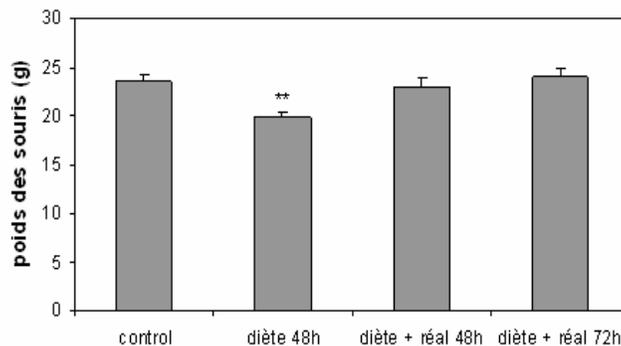
3.2.1.3 Modèle d'atrophie induite par une diète prolongée

Une condition de jeûne prolongé a été utilisée comme seconde approche pour obtenir un modèle expérimental d'atrophie. Nous avons soumis plusieurs groupes de souris sauvages à une diète de 48h suivie ou non d'une période de réalimentation de 48 à 72h. Un groupe d'animaux, de même sexe et de même âge que les animaux traités, a été utilisé comme témoin (*fiche technique n°6*). Pour chaque groupe, les animaux ont été pesés au début et à la fin du protocole, puis sacrifiés en fin de traitement après prélèvement et pesée des TA, EDL et soleus.

L'analyse révèle que la diète entraîne une perte significative d'environ 15 % du poids total des animaux (*figure 21A*) et que le tissu musculaire est touché par un tel traitement, comme le montrent les poids des 3 muscles étudiés (*figure 21B*). Après 48h de réalimentation, le poids des souris est de nouveau normal, tandis qu'il faut attendre 72h pour un retour à la normale du poids des muscles.

L'expression de CARP dans les extraits a été quantifiée par PCR quantitative après homogénéisation des muscles dans le tampon adéquat et extraction des ARNm (*fiche technique n°8*). Le niveau de l'expression de CARP dans le muscle est doublé après la période de diète (*figure 21C*), suggérant que CARP participe soit à la mise en place de l'atrophie provoquée par la diète soit à des mécanismes visant à lutter contre cette atrophie. Son expression revenant à son taux basal après réalimentation, la phase de récupération de la masse musculaire semble donc indépendante de CARP.

A Poids des animaux



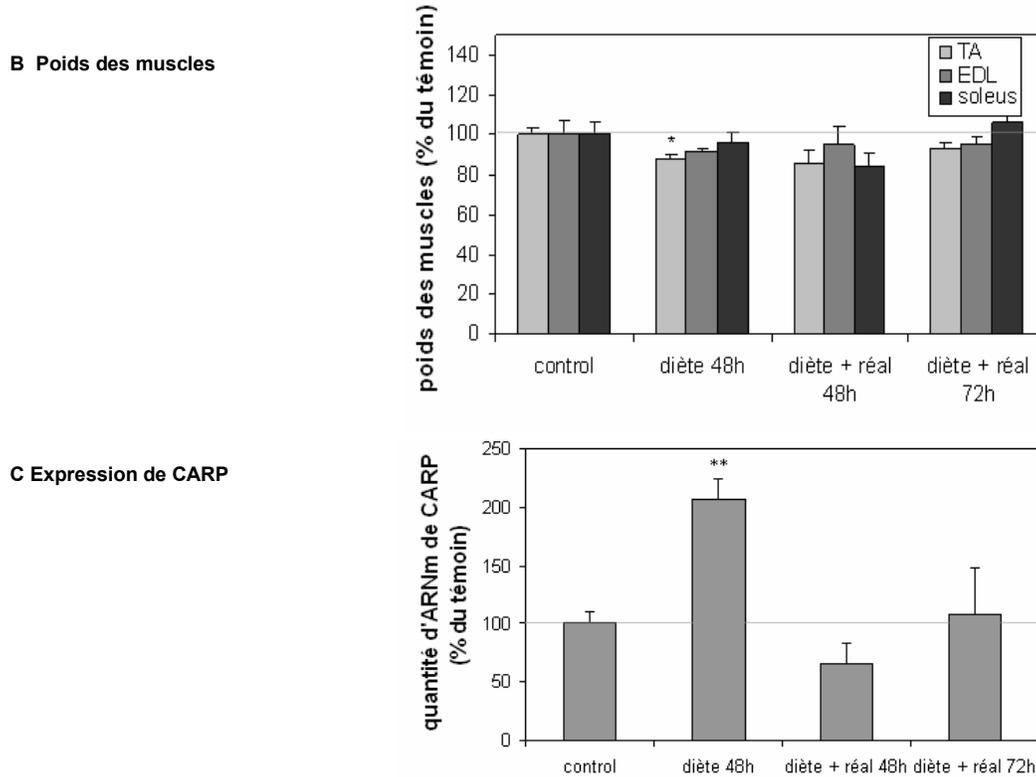


Figure 21 : La diète a un effet sur le poids des souris, le poids des muscles et l'expression de CARP

Des souris sauvages (129SvPaslco) sont privées de nourriture (eau maintenue) pendant 48h, puis l'alimentation est réintroduite dans les cages. Certains sujets subissent ainsi une réalimentation de 48h, d'autres de 72h. Les animaux témoins ne subissent pas de diète et sont de même poids et de même sexe que les autres animaux à J0. **A/** le poids des souris (en g) est significativement diminué suite à la diète. n = 4 ; ** p<0,01 **B/** On observe également une baisse du poids des TA, EDL et soleus (les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux poids des muscles des animaux témoins). n = 4 ; * p<0,05 **C/** L'expression de CARP dans les TA est quantifiée par PCRQ et normalisée par rapport à l'expression du gène PO. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'expression mesurée dans les muscles des témoins. n = 4 ; ** p<0,01

L'ensemble de ces résultats indique que l'expression de CARP est systématiquement stimulée dans toutes les conditions d'atrophie examinées.

3.2.2 Effet de la surexpression de CARP *in vivo*

3.2.2.1 Effet de CARP sur le poids des muscles, le diamètre des fibres musculaires et l'apoptose

Nous avons mis en évidence que la protéine CARP est surexprimée dans les différents modèles que nous avons étudiés. Toutefois, il n'a pas encore été démontré que cette dérégulation soit une cause ou une conséquence de la dégradation musculaire observée lors de ces événements. Afin de répondre à cette question et de préciser si l'effet de CARP sur l'état du muscle a un rôle plutôt aggravant ou plutôt compensateur, nous avons décidé d'examiner l'effet de la surexpression de CARP *in vivo* pendant un mois.

Il nous fallait, pour cela, être certains de surexprimer suffisamment et à long terme, la protéine CARP dans le muscle murin. L'utilisation d'un simple plasmide comme vecteur ne permettant ni une expression de CARP à long terme, ni un transfert très efficace du gène d'intérêt dans la totalité du muscle, nous avons donc choisi de produire un vecteur Adeno-Associated Virus recombinant (AAVr) abondamment décrit pour ses capacités à transduire efficacement le tissu musculaire (Bartoli *et al.*, 2007; Bartoli *et al.*, 2006c; Clark *et al.*, 1996).

Nous avons produit un AAVr exprimant la protéine de fusion CARP-eYFP (*fiche technique n°1*) afin de pouvoir évaluer le nombre de fibres transduites grâce à la fluorescence émise lors de l'excitation de l'étiquette eYFP introduite dans le vecteur.

Un mois après injection du vecteur en intramusculaire (*fiche technique n°6*), nous avons observé les muscles injectés au microscope confocal (*fiche technique n°5*), ce qui nous a permis d'attester d'une surexpression efficace puisqu'un grand nombre de fibres exprimaient encore à ce moment la protéine de fusion CARP-eYFP (*figure 22A*). Les muscles ont ensuite été prélevés et pesés avant d'être soumis à différentes analyses.

Nous avons d'abord vérifié la surexpression de CARP dans nos extraits en mesurant le niveau d'ARNm par PCR quantitative (*fiche technique n°8*). Nos résultats indiquent que le niveau d'expression de CARP est très significativement augmenté (d'un facteur supérieur à 100) dans les muscles injectés par rapport aux muscles témoins (*figure 22B*).

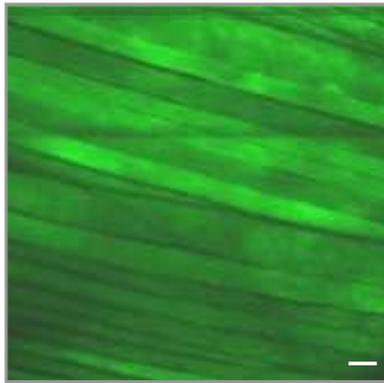
D'autre part, l'intégrité du tissu suite à la surexpression de CARP a été contrôlée par observation des coupes transversales de ces muscles après coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) (*fiche technique n°5*). Le tissu musculaire ne semble pas endommagé suite à la forte expression de CARP comme en témoignent les images des coupes transversales de muscles (*figure 22C*).

Par ailleurs, l'effet de la surexpression de CARP sur le nombre et la taille des fibres musculaires a été étudié par analyse morphométrique (*fiche technique n°5*). Nos résultats indiquent que la surexpression efficace de CARP dans le TA de souris, pendant une période de 30 jours, ne modifie pas le poids des muscles (*figure 22D*), ni le diamètre des fibres, ni le nombre total de fibres par muscle (*figure 22E*).

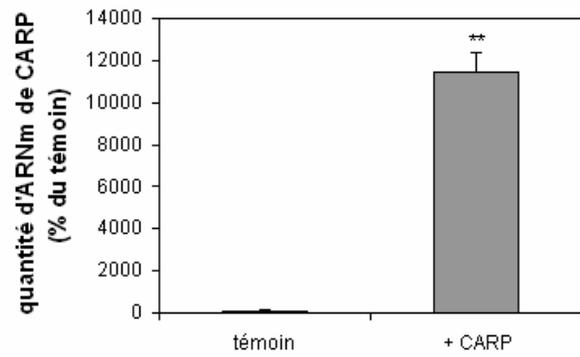
Enfin, la surexpression de CARP pendant un mois n'ayant pas d'effet sur le nombre de fibres, peut-être en raison d'une durée trop courte de l'expérience, nous avons réalisé un immunomarquage des noyaux apoptiques sur les coupes transversales des muscles (technique TUNEL *fiches techniques n°5 et 6*). En effet, l'apoptose – ou mort cellulaire programmée – est un mécanisme complexe qui participe également au processus d'atrophie musculaire. NF- κ B p65, décrit pour avoir un rôle anti-apoptotique est d'ailleurs inhibé lorsque l'apoptose est stimulée au cours de l'atrophie. Or nous avons montré précédemment que CARP inhibe l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur *in vitro* (voir partie 2 des résultats).

Lors de l'observation de ces coupes au microscope confocal, nous n'avons pas constaté de noyaux apoptotiques dans les muscles injectés (*figure 22F*). La surexpression de CARP ne semble donc pas entraîner le phénomène d'apoptose dans ces conditions.

A TA transduit par le vecteur AAV-CARP-eYFP



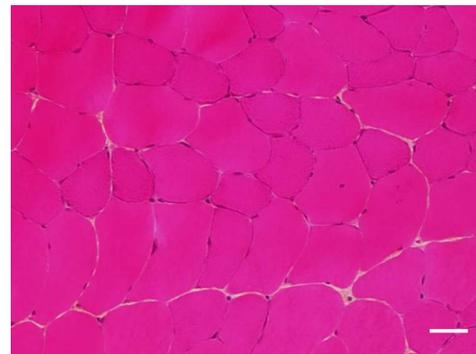
B Surexpression de CARP



C Colorations Hématoxyline-Phloxine-Safran

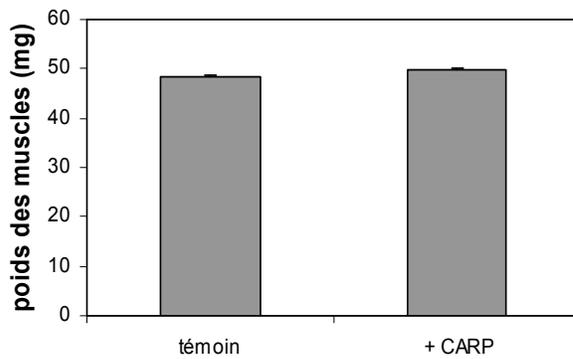


Muscle témoin

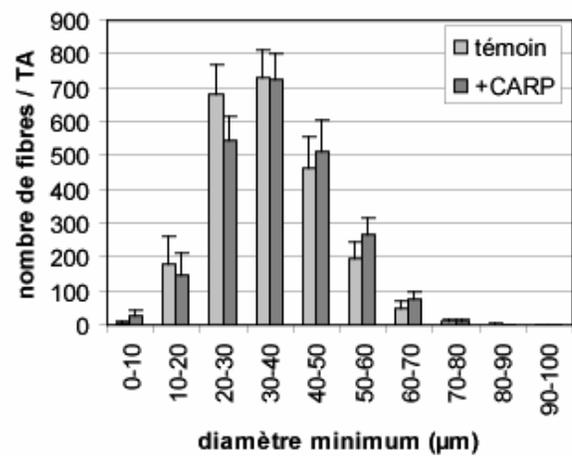


Muscle surexprimant CARP

D Poids des muscles



E Analyse morphométrique



F Marquage des noyaux apoptotiques

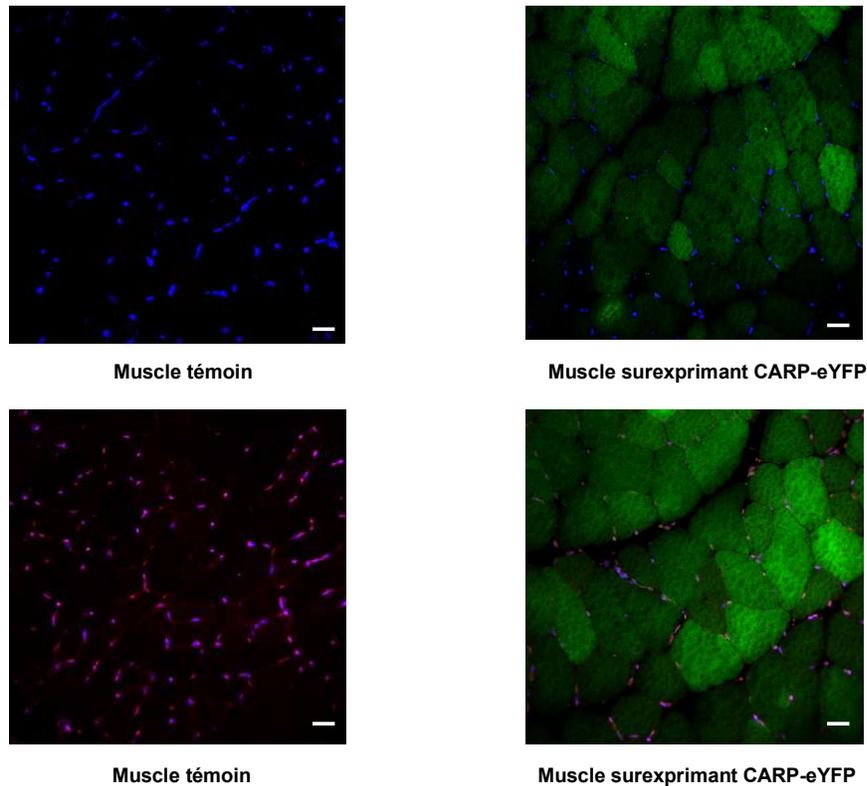


Figure 22 : La surexpression de CARP ne modifie ni le poids des muscles ni la taille des fibres musculaires et ne fait pas apparaître de noyaux apoptotiques

A/ 1 mois après injection du vecteur AAV-CARP-eYFP en intramusculaire dans le tibialis antérieur de souris 129SvPaslco, nous avons observé l'efficacité de transduction du muscle par microscopie confocale (objectif 20X). Toutes les fibres à la surface du muscle expriment la protéine CARP fluorescente (en vert). La barre d'échelle représente 50 μm . **B/** L'expression de CARP, dans les muscles injectés, est quantifiée par PCR quantitative et normalisée par rapport à l'expression de PO. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'expression mesurée dans les muscles témoins $n = 4$; ** $p < 0,01$. **C/** D'après les colorations HPS réalisées sur les coupes transversales des muscles, les tissus ne sont pas altérés après surexpression de CARP (objectif 10x). Les barres d'échelle représentent 20 μm . **D/** Le poids des muscles injectés est comparé au poids des muscles témoins (controlatéraux). Aucune différence significative n'est constatée quant au poids des muscles injectés par rapport au poids des muscles témoins $n = 4$. **E/** Analyse morphométrique des muscles surexprimant CARP : le diamètre minimum des fibres n'est pas différent dans les muscles injectés en comparaison aux muscles témoins. Le nombre total de fibres ne varie. $n = 4$. **F/** Un marquage des noyaux apoptotiques (TUNEL) est réalisé sur coupes transversales des muscles. Sur ces images en microscopie à fluorescence, CARP est représenté en vert, les noyaux colorés au DAPI sont représentés en bleu et le marquage TUNEL est représenté en rouge. En haut, les images correspondent aux muscles d'intérêt. En bas, les images correspondent aux témoins positifs de l'expérience. Les barres d'échelle représentent 15 μm .

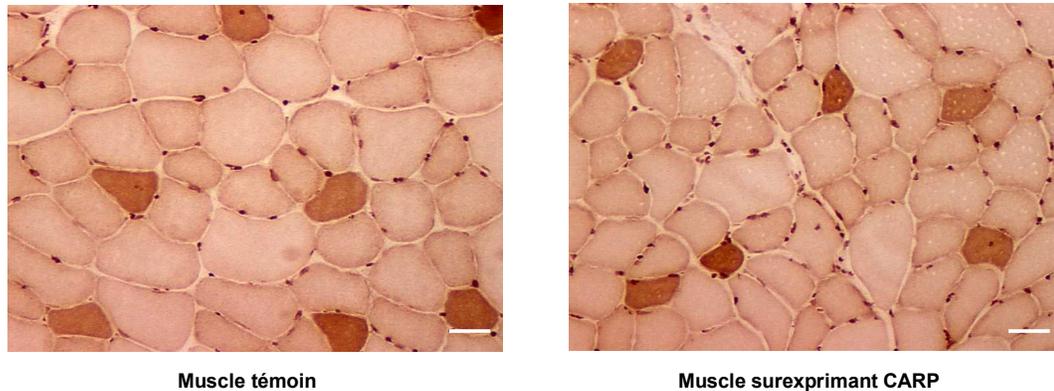
3.2.2.2 Effet de CARP sur les différents types de fibres

N'ayant pas observé d'effet de la surexpression de CARP sur certains des éléments modifiés lors de processus atrophiques, nous avons ensuite souhaité savoir si l'expression de CARP pouvait influencer le type de myosines exprimées dans la fibre musculaire et participer de cette façon à des événements de remodelage. Nous avons, pour cela, réalisé des marquages enzymatiques des myosines lentes (*fiche technique n°5*) sur des coupes transversales de muscles ayant (ou non) reçu préalablement le vecteur AAV-CARP-eYFP en injection intramusculaire (*fiche technique n°6*).

A partir des images obtenues lors de l'observation des lames (figure 23A), le nombre de fibres positives pour le marquage des myosines lentes a été évalué par comptage sur 3 niveaux de coupes différents (par muscle). En comparant 6 muscles injectés avec 6 muscles témoins, nous avons pu constater que la surexpression de CARP pendant un mois entraîne une diminution du nombre de fibres lentes (figure 23B).

La surexpression de CARP semble donc avoir un effet sur le type de fibres composant le muscle dans les conditions de notre expérience.

A



E

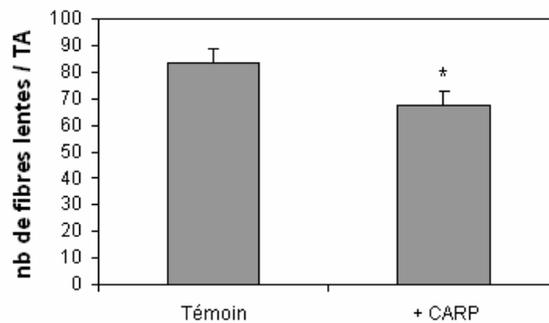


Figure 23 : la surexpression de CARP entraîne une diminution du nombre de fibres lentes

1 mois après injection de pAAV-CARP-eYFP en intramusculaire dans les TA de souris, les muscles injectés sont prélevés et des coupes transversales sériées (10 μ m d'épaisseur) sont réalisées. **A/** Les fibres lentes sont repérées par immunomarquage des myosines lentes colorées en brun sur ces images (à gauche : muscle témoin, à droite : muscle injecté). Les barres d'échelle représentent 20 μ m. **B/** Le nombre de fibres lentes présentes dans les muscles surexprimant CARP est comparé au nombre de fibres lentes dans les muscles témoins. Le nombre de fibres lentes par muscle est significativement diminué dans les muscles surexprimant CARP par rapport aux muscles témoins. n = 6 ; * p<0,05.

La surexpression de CARP dans les muscles de souris pendant un mois n'a pas induit de signes atrophiques dans les conditions de notre expérience. En revanche, elle a permis de mettre en évidence un effet de CARP sur la composition du muscle en types de fibres, suggérant d'avantage un rôle de CARP dans des mécanismes de remodelage plutôt que dans la mise en place de processus atrophiques.

3.2.3 Vers la thérapie

D'après nos résultats, CARP pourrait représenter un marqueur des muscles dystrophiques. Le contrôle de sa surexpression dans certaines pathologies pourrait permettre de proposer des solutions thérapeutiques pour les dystrophies.

Nous avons donc développé plusieurs outils pour atteindre cet objectif. Dans un premier temps, nous avons utilisé la stratégie anti-sens pour expérimenter l'inhibition de CARP comme approche thérapeutique. Dans un second temps, nous avons caractérisé le promoteur du gène codant CARP afin de mieux comprendre comment son expression est régulée dans le muscle squelettique et d'identifier les molécules potentiellement capables d'influencer sa transcription.

3.2.3.1 Inhibition de CARP par stratégie anti-sens : preuve de principe

Nous avons choisi d'appliquer la stratégie de « l'interférence ARN » en utilisant des small interfering RNA (siRNA) dirigés spécifiquement contre CARP. Ces courtes séquences oligonucléotidiques (21-23 pb) sont parfaitement complémentaires d'un fragment de la séquence de l'ARNm cible et permettent de le dégrader grâce à l'intervention d'enzymes endogènes : DICER et le complexe RISC (Elbashir *et al.*, 2001) (pour revue Schutze, 2004). Ce procédé conduit donc à une diminution de la quantité de protéine synthétisée. Différents siRNA spécifiques de l'ARNm codant la protéine CARP ont été choisis grâce à des logiciels accessibles sur le site web « SiSearch » (<http://www.cgb.ki.se/cgb/services/servers.html>). Nous avons déterminé ainsi les séquences théoriquement les plus efficaces puisqu'elles ont obtenu un score élevé en appliquant différentes règles de sélection : un score supérieur à 6 avec les règles de Reynolds et les règles de Stockholm et un score « high » avec les règles de Tree (Chalk *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2004). 2 siRNA (siRNA-CARP-13 et siRNA-CARP-328) ont été conçus et testés *in cellulo* pour leur efficacité à interférer avec l'ARNm de CARP.

Les cellules musculaires en culture n'exprimant pas la protéine CARP a des niveaux détectables par western-blot, l'efficacité de nos siRNA a été testée sur des cellules NIH3T3 -lignée facilement transfectable-co-exprimant le plasmide pcDNA3.1-CARP-V5 et les siRNA testés (*fiche technique n° 2*). Les cellules ont également été transfectées avec un plasmide codant eYFP afin de visualiser les cellules ayant reçu les plasmides et exprimant, par voie de conséquence, CARP et/ou les siRNA.

L'analyse en western-blot (*fiche technique n°3*) montre une disparition presque complète de la bande de 43 kDa correspondant à CARP en présence de l'un ou l'autre des 2 siRNA, confirmant leur efficacité (*figure 24, hybridation anti-V5*). Nous avons vérifié leur spécificité en réhybridant la membrane avec un anticorps anti-GFP et avons pu constater que l'expression d'eYFP n'est pas inhibée en présence des siRNA 13 et 328 (*figure 24, hybridation anti-GFP*) : les oligonucléotides choisis permettent donc d'obtenir des activités siRNA efficaces et spécifiques de la protéine CARP.

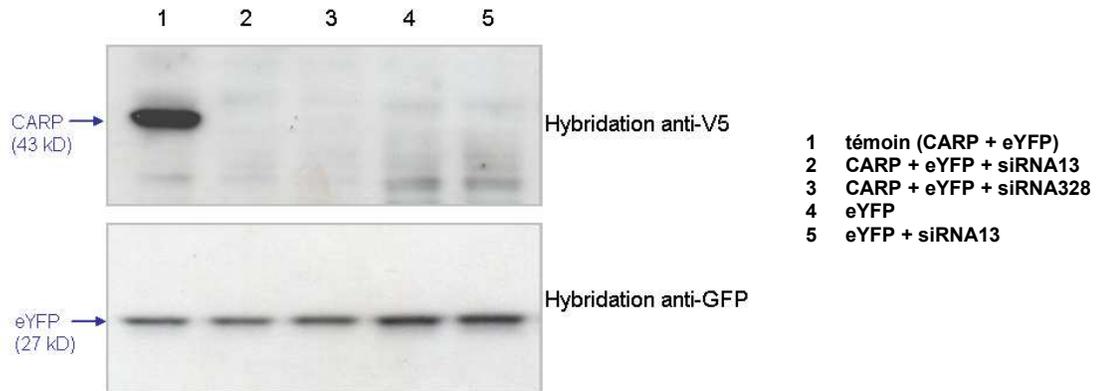


Figure 24 : Les siRNA 13 et 328 dirigés contre CARP sont efficaces *in cellulo*

Après co-transfection de fibroblastes NIH3T3 par les plasmides pcDNA3.1-CARP-V5 et peYFP, en présence ou non des siRNA13 et 328 dirigés contre CARP, l'efficacité des siRNA (testée sur l'expression de CARP par western-blot, anticorps anti-V5 dilué au 1:5000) et leur spécificité (testée par leur effet sur l'expression d'eYFP, anticorps anti-GFP dilué au 1:500) sont confirmés.

Les premières tentatives pour tester nos séquences interférentes *in vivo* dans le muscle murin ont malheureusement échoué en raison de leur instabilité et de la relative faible perméabilité du muscle pour ce type de molécules. Dans le but d'améliorer le transfert *in vivo* des siRNA, les deux séquences ont été vectorisées dans le plasmide pAAV-shRNA-CARP afin de produire des particules AAV recombinantes (*fiche technique n°1*). Le vecteur AAV-shRNA-CARP, permet ainsi la libération de *small hairpin RNA* (shRNA), autorisant une expression stable et durable dans le temps des 2 siRNA d'intérêt grâce à leur conformation en « tête d'épingle » (Paddison *et al.*, 2002; Paul *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). De plus, ce vecteur offre la possibilité de vérifier la bonne efficacité du transfert de gène, puisqu'il porte également la séquence codant la *murine Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase* (muSEAP), protéine sécrétée dont l'activité est facilement mesurable dans le sérum (*figure 25A*). De façon similaire à l'expérience réalisée *in cellulo*, la protéine CARP-eYFP a été surexprimée dans le muscle afin de pouvoir valider l'efficacité du vecteur AAV-shRNA-CARP sur l'expression de CARP.

Un mois après injection des vecteurs, le niveau d'expression de CARP a été quantifié par PCR quantitative (*fiche technique n°8*) dans les muscles ayant reçu seulement le vecteur AAV-CARP-eYFP (« AAV-CARP »), dans les muscles ayant reçu les deux vecteurs (« AAV-CARP + AAV-shRNA-CARP ») et dans les muscles témoins. Les muscles ayant reçu le vecteur AAV-CARP-eYFP présentent une surexpression significative de CARP qui est presque éteinte lors de la co-injection avec l'AAV-shRNA-CARP (*figure 25B, à gauche*). Ces résultats ont été confirmés en western-blot (*fiche technique n°3*) par détection de la protéine CARP-eYFP (poids moléculaire apparent de 90kDa) grâce à un anticorps spécifique produit chez le lapin. La constance du dépôt en protéines a été vérifiée grâce à l'hybridation anti-actine (*figure 25B, à droite*).

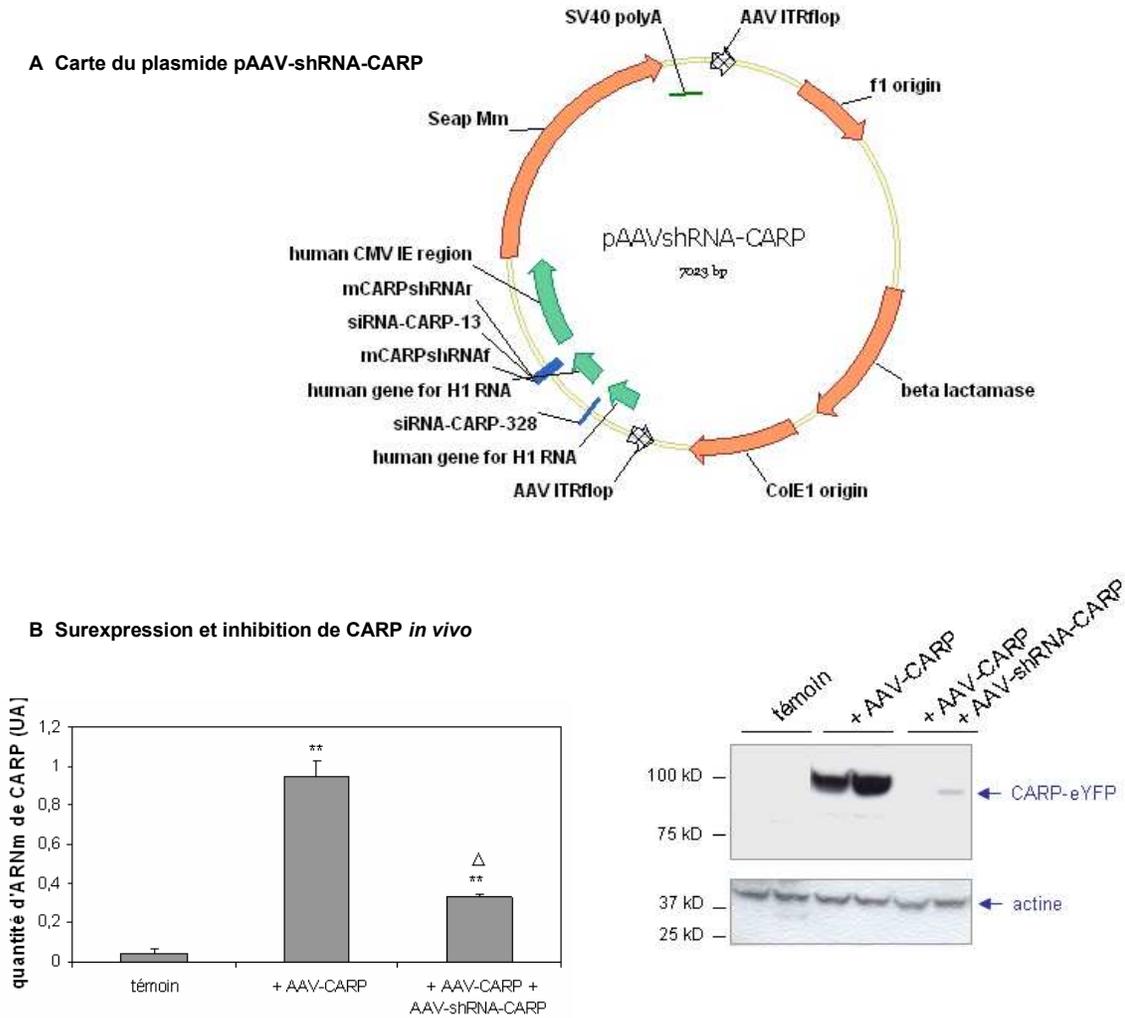


Figure 25 : Le vecteur AAV-shRNA-CARP est efficace pour inhiber l'expression de CARP *in vivo*

A/ carte schématique du plasmide pAAV-shRNA-CARP utilisé pour vectoriser les 2 siRNA testés *in cellulo*. Le plasmide contient également la séquence d'un gène rapporteur : celui codant la muSEAP. **B/** Les vecteurs AAV-shRNA-CARP et AAV-CARP-eYFP sont co-injectés dans des muscles de souris par voie intramusculaire. Un mois plus tard, les souris sont sacrifiées et les muscles injectés (ainsi que les muscles témoins) sont prélevés.

L'expression de CARP est quantifiée par PCRQ et normalisée par rapport à l'expression de PO (à gauche). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires, $n = 4$; ** $p < 0,01$ par rapport au témoin, ^Δ $p < 0,05$ par rapport à l'échantillon « + AAV-CARP ». La protéine CARP est visualisée par western-blot à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre CARP (dilué au 1:500) (à droite). L'hybridation avec un anticorps dirigé contre l'actine permet d'attester d'une quantité équivalente de protéines dans chaque puits. Le vecteur AAV-shRNA-CARP est efficace pour diminuer l'expression de CARP (au niveau ARNm et protéine).

Afin d'établir le rôle de CARP dans le remodelage et de valider l'inhibition de CARP comme solution thérapeutique, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de diminuer la surexpression de CARP observée dans ces conditions. La première condition testée a été la dénervation, puisqu'il s'agit d'une condition d'atrophie ne présentant pas les complications dues aux cycles de nécrose-régénération caractéristiques des dystrophies musculaires.

Comme nous l'avons montré précédemment (figure 20F), l'expression de CARP augmente significativement dans le TA dès le troisième jour suivant la dénervation du membre. Pour obtenir une interférence ARN efficace avec un délai adéquat, l'AAV-shRNA-CARP a été injecté dans le TA de souris 129SvPaslco 10 jours avant de leur faire subir une dénervation définitive du membre postérieur correspondant (fiche technique n°6). Les animaux ont été sacrifiés 3 jours, 9 jours, 14 jours ou 21 jours après la dénervation. Les muscles TA ont été prélevés et pesés, puis des coupes transversales ont été réalisées en vue d'analyses histologiques.

La coloration de la muSEAP sur les coupes histologiques (fiche technique n°5) a permis de visualiser l'efficacité de transfert du vecteur. Malgré une répartition satisfaisante de muSEAP dans les muscles injectés, et donc à priori de shRNA-CARP, aucun effet significatif n'a été observé sur le poids des muscles (comparaison aux muscles dénervés injectés en PBS) (figure 26A et B).

A Répartition du vecteur AAV-shRNA-CARP



B Poids des muscles

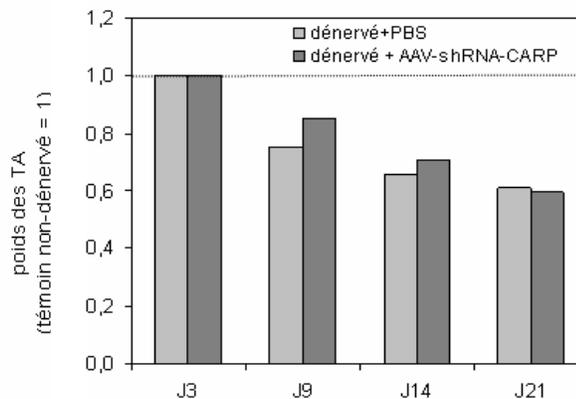


Figure 26 : inhibition de CARP par interférence ARN en contexte de dénervation

Le vecteur AAV-shRNA-CARP est injecté dans les TA de souris ayant subi une dénervation du membre postérieur. 3, 9, 14 ou 21 jours après dénervation, les muscles sont prélevés et analysés. **A/** La coloration de la muSEAP sur les coupes transversales des muscles traités (à droite, par rapport au témoin injecté en PBS présenté à gauche) permet d'attester de l'homogénéité de la répartition du vecteur AAV-shRNA-CARP dans les muscles d'intérêt. **B/** L'AAV-shRNA-CARP ne semble pas corriger la perte de poids des TA observée après dénervation (poids des muscles exprimés en % des muscles témoins non-dénervés).

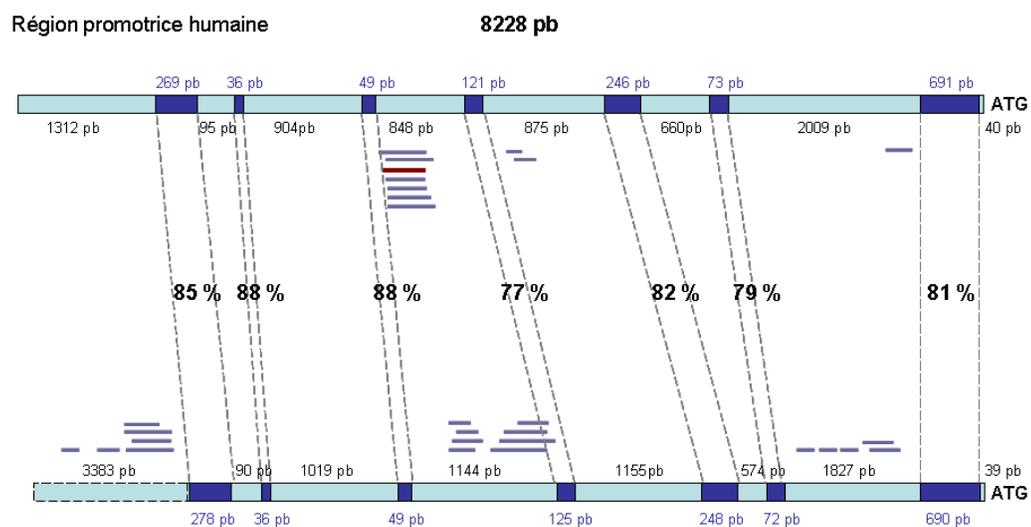
3.2.3.2 Analyse *in silico* du promoteur du gène de CARP

Dans le cœur, suite à une stimulation par des cytokines, le $TNF\alpha$ par exemple, l'expression de CARP est activée via la voie Nkx2.5 (Zou *et al.*, 1997). Il a été montré également que lorsque CARP est surexprimé dans des cardiomyocytes, la voie Nkx2.5 est perturbée et l'expression de la troponine C est inhibée (Jeyaseelan *et al.*, 1997). Dans les muscles lisses des vaisseaux sanguins, CARP jouerait un rôle anti-prolifératif. Après stimulation de la voie $TGF\beta/Smad$, l'expression de CARP est augmentée stimulant l'expression de $p21^{WAF1/CTP1}$, un inhibiteur de la kinase p21. Il en résulte une diminution du ratio ppRb/pRb entraînant une diminution de la synthèse d'ADN (Kanai *et al.*, 2001).

Puisque l'expression de CARP est influencée par des hormones ou des cytokines, il semble envisageable d'agir sur le promoteur de CARP en utilisant des agents pharmacologiques. Nous avons donc réalisé une analyse *in silico* du promoteur du gène codant CARP. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de l'empreinte phylogénétique qui consiste à déterminer les régions de forte homologie entre les séquences promotrices de plusieurs espèces (ici l'homme et la souris) et de rechercher dans ces régions d'éventuels sites de fixation de facteurs de transcription (Wasserman *et al.*, 2000).

Chez la souris, le gène est localisé sur le chromosome 19 dans la région 19qC3 (locus NT 039687). Chez l'homme, le gène est situé sur le chromosome 10 à la position p10q23.31 (locus NT 030059). Les séquences codantes présentent 87 % d'homologie (90% pour les séquences protéiques). Les séquences des promoteurs humain et murin ont été comparées à l'aide du logiciel Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 2 séquences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990).

Au sein de la séquence génomique, 7 régions fortement conservées présentent une homologie de plus de 75 % : immédiatement en 5' de l'ATG de CARP (691 pb) et à environ 2,7 Kb (73 pb), 3,5 Kb (246 pb), 4,6 Kb (121 pb), 5,6 Kb (49 pb), 6,5 Kb (36 pb) et 6,7 Kb (169 pb) (Séquence humaine, figure 27). D'autre part nous avons comparé les séquences des promoteurs avec les séquences contenues dans les banques d'Expressed Sequence Tags (EST) afin de mettre en évidence la présence potentielle d'autres gènes (figure 27).



Région promotrice murine

10729 pb

- Zone de forte homologie (> 70 %)
- Zone non homologue
- EST
- Séquences répétées type ALU

Figure 27 : Représentation des régions conservées entre séquences promotrices humaine et murine du gène de CARP

Nous avons recherché les sites de reconnaissance de facteurs de transcription dans la région conservée située à proximité de l'ATG. La séquence génomique (800 pb en amont du codon d'initiation) a été comparée, à l'aide des logiciels *MatInspector* (Quandt *et al.*, 1995), *GENOMATIX BiblioSphère* et *TFSEARCH* aux séquences consensus conservées au sein des différentes espèces et référencées dans différentes bases de données. Bien que la mise en évidence des sites de fixation ne soit pas suffisante pour prouver une activité transcriptionnelle des facteurs de transcription, elle permet au moins de la supposer.

Les séquences de reconnaissance des facteurs FREAC2, 4 et 7, ainsi que celles de facteurs C-rel et NF- κ B sont retrouvées à plusieurs reprises au sein de la séquence du promoteur de CARP (figure 28). L'analyse du promoteur de CARP permet donc de suggérer que la famille des facteurs à domaine Forkhead (FKHD) ainsi que certains facteurs NF- κ B, impliqués dans l'apoptose, pourraient réguler l'expression de CARP. D'autres motifs intéressants sont présents pour les facteurs NKXH et GATA, en particulier les sites de reconnaissance des facteurs NKX2.5 et GATA4 déjà décrits pour activer l'expression de CARP (Zou *et al.*, 1997). Des motifs très répandus, tels que les sites de reconnaissance des Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) ou encore les boîtes TATA sont également retrouvés sur la séquence promotrice. La liste des motifs recensés n'étant évidemment pas exhaustive, nous avons focalisé notre attention sur ceux cités ci-dessus et avons représenté schématiquement le promoteur de CARP avec des exemples de localisation de ces différentes boîtes (figure 28). Ces données devraient permettre de proposer des molécules aptes à réguler l'expression de CARP.

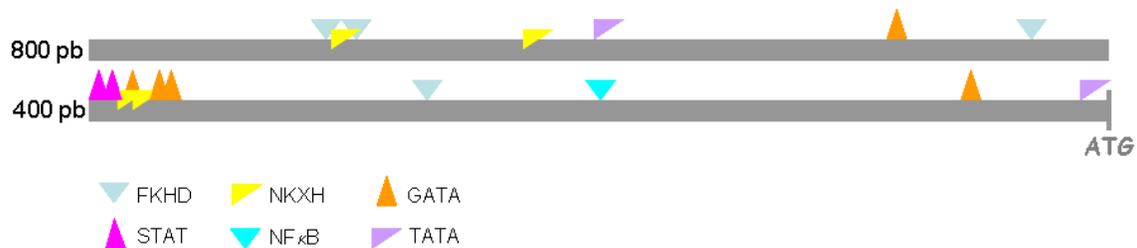


Figure 28 : représentation schématique du promoteur du gène CARP

Les sites de fixation potentiels pour des facteurs de transcription, ainsi que leur position en 5' de l'ATG, sont indiqués sur la séquence du promoteur du gène CARP (800 pb en amont du codon d'initiation) représentée schématiquement sur cette figure (échelle non-contractuelle).

3.3 Conclusion

Lors de cette étude, nous avons mis en évidence la surexpression systématique de CARP dans le muscle squelettique au cours de différentes conditions atrophiques : plusieurs modèles murins de dystrophies musculaires, après la dénervation et après une période de diète. CARP pourrait donc être considéré comme un marqueur de l'atrophie. Toutes les conditions dans lesquelles CARP est surexprimé sont associées à un remaniement musculaire, suggérant un rôle de CARP dans ces mécanismes. Nos expériences de surexpression de CARP *in vivo* n'ont pas permis d'identifier clairement le rôle de CARP au cours du développement du processus atrophique. En revanche, nos résultats suggèrent fortement qu'il pourrait participer aux mécanismes de remodelage du sarcomère, notamment en modifiant la composition en types de fibres du muscle.

La participation de CARP dans les mécanismes physiopathologiques nous a conduits à envisager son inhibition comme stratégie thérapeutique. Nous avons développé un vecteur AAVr exprimant des séquences siRNA dirigées spécifiquement contre l'ARNm de CARP. Les premières expériences d'inhibition de CARP dans

un contexte de dénervation sont encourageantes. Une de nos perspectives est de tester ce vecteur dans des modèles de dystrophies musculaires en espérant en diminuer les signes cliniques de dystrophie.

L'analyse de la séquence du promoteur de CARP offre également de nombreuses perspectives dans le domaine thérapeutique. En effet, afin de valider les résultats théoriques décrits ci-dessus et d'identifier les facteurs capables de réguler l'expression de CARP, nous avons créé un système rapporteur. La séquence du promoteur de CARP a été clonée dans le vecteur pGL3 en amont de la séquence du gène luciférase. Grâce à ce plasmide, nous avons établi une lignée de cellules exprimant de manière stable la luciférase sous la dépendance du promoteur de CARP. En effet, après intégration du vecteur dans leur génome, ces cellules sont devenues résistantes à un antibiotique et ont pu ainsi être sélectionnées. Elles constituent dès lors un outil adéquat pour réaliser un criblage des molécules capables d'inhiber l'expression de CARP. Ce qui permettra également d'envisager des pistes pour prévenir la surexpression pathologique de CARP.

DISCUSSION

Cette étude a été menée dans le but de déterminer les fonctions physiologiques de la calpaïne 3 dans le muscle squelettique et de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques dus à sa déficience dans la dystrophie des ceintures de type 2A. Ainsi, en explorant le rôle de la calpaïne 3, nous avons mis en évidence un nouveau substrat de cette protéase : la protéine CARP. Nous avons montré qu'en clivant CARP, la calpaïne 3 pourrait moduler sa fonction de régulateur de la transcription. Nous avons de plus identifié pour ce facteur un certain nombre de cibles et de partenaires qui pourraient jouer un rôle essentiel dans la plasticité musculaire.

D'autre part, nous avons constaté que l'expression de CARP est systématiquement augmentée dans différents modèles murins de dystrophie et d'atrophie musculaires, ce qui est compatible avec l'idée que ce facteur pourrait être impliqué dans les mécanismes physiopathologiques mis en place dans ces situations. De plus, nous avons mis en évidence une régulation positive de l'expression du facteur FoxO1 spécifique de la LGMD2A, suggérant un lien singulier entre ce facteur et la calpaïne 3.

Cette discussion vise à évaluer la pertinence de nos résultats et est fondée en partie sur des résultats préliminaires non-encore confirmés mais présentant un intérêt pour l'élaboration d'hypothèses de travail. Elle est organisée en deux parties principales. La première aborde la relation fonctionnelle de CARP avec la calpaïne 3 en regard du rôle physiologique de la calpaïne 3 dans le muscle squelettique. La seconde partie documente le rôle de CARP dans les dystrophies musculaires et celui de FoxO1 dans la LGMD2A. Ces études ont permis de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques pour la LGMD2A, mais également pour d'autres pathologies musculaires.

1 Fonctions de la calpaïne 3 dans la plasticité musculaire

1.1 Régulation fonctionnelle de CARP par la calpaïne 3

Au cours de cette étude, nous avons recherché de nouveaux candidats clivables par la calpaïne 3 parmi les protéines présentes à proximité de la protéase dans la bande N2A du sarcomère. Nous avons démontré que la calpaïne 3 interagit directement avec et clive la protéine CARP *in vitro*. Jusqu'à ce jour, les substrats potentiels de la calpaïne 3 identifiés correspondent à des protéines du cytosquelette (Cohen *et al.*, 2006; Guyon *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2007; Taveau *et al.*, 2003), des protéines présentes dans les adhésions focales (Taveau *et al.*, 2003), des protéines participant à la synthèse et la dégradation protéique (Kramerova *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2007) et des acteurs du métabolisme glucidique (Cohen *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007). Bien qu'il soit connu que les calpaïnes ubiquitaires dégradent les facteurs de transcription c-Jun et c-Fos (Hirai *et al.*, 1991), p53 (Gonen *et al.*, 1997; Kubbutat et Vousden, 1997), N-myc (Gonen *et al.*, 1997) et YY1 (Walowitz *et al.*, 1998), nous démontrons pour la première fois, dans cette étude, que la calpaïne 3 a pour substrat un facteur régulateur de la transcription.

De façon intéressante, CARP comprend deux séquences PEST, domaines qui sont souvent retrouvés dans des protéines instables (Rogers *et al.*, 1986). De façon surprenante, le clivage mis en évidence au cours de notre étude n'a pas lieu dans l'une de ces séquences, mais dans une région extrêmement structurée coiled-coil. Cette observation semble en contradiction avec l'idée généralement admise, que la conformation du substrat dirige le clivage et que les zones peu structurées, souvent situées à la jonction de deux domaines fonctionnels, sont des cibles privilégiées (Ghosh *et al.*, 2005). Il a par exemple été démontré que la calpaïne 3 clive la filamine C en aval de son domaine de dimérisation, entraînant la suppression de ses interactions avec les δ - et γ -sarcoglycanes (Guyon *et al.*, 2003). De même, il a été rapporté que les calpaïnes coupent la PKC α au niveau de

la région charnière située entre domaine catalytique et domaine régulateur (Kikuchi et Imajoh-Ohmi, 1995) ainsi que la vimentine et la sous-unité 1 du récepteur au glutamate (GluR-1) dans différentes régions peu structurées (Bi *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1986).

De façon intéressante, un potentiel NLS bipartite -constitué de deux motifs basiques interdépendants- a été mis en évidence dans la région coiled-coil de CARP. Ce NLS semble d'ailleurs fonctionnel, puisque la protéine est détectée aussi bien dans le sarcomère que dans le noyau de la fibre (Bang *et al.*, 2001b; Ishiguro *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003; Tsukamoto *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 1997). La reconnaissance de la protéine et sa prise en charge par la machinerie cellulaire permettant l'import nucléaire requièrent l'accessibilité du NLS (pour revue consulter Lange *et al.*, 2007). Bien que cela n'ait encore jamais été proposé, cette accessibilité pourrait également permettre à ce type de protéines d'être ciblées par des protéases. Il est ainsi possible que le clivage de CARP par la calpaïne 3 soit dirigé vers la région comprenant le NLS afin de le détruire. Il faut noter que nous avons montré que la calpaïne 1 est également capable de cliver CARP dans la même région *in vitro* et qu'un produit de clivage similaire est retrouvé après surexpression ectopique de CARP dans des cellules CHO (Chu *et al.*, 1995). Cette non-spécificité du clivage est en accord avec l'hypothèse d'un accès facilité pour les protéases dans cette région. En conclusion, nos expériences sont les premières à mettre en évidence la possibilité d'un clivage au sein d'un NLS et à suggérer qu'une protéine de la famille des calpaïnes puisse permettre ce type de régulation.

L'étude des différents fragments de CARP générés par le clivage suggère que, après coupure par la calpaïne 3, l'interaction de CARP avec la région N2A est renforcée. Ceci semble compatible avec l'hypothèse que la présence de la protéase pourrait permettre de stabiliser le complexe CARP/titine N2A, puisque nous avons également démontré que l'absence de calpaïne 3 dans la souris déficiente s'accompagne d'une réduction de l'affinité entre la protéine CARP et la région N2A de la titine par rapport à une souris contrôle. Ces données suggèrent donc que la présence et/ou l'activité de la calpaïne 3 va avoir pour conséquence la réduction de la translocation nucléaire de CARP. Bien que la démonstration soit nouvelle dans le cas de la calpaïne 3, il est déjà bien connu que certaines protéases sont impliquées dans le contrôle de la présence au noyau de protéines participant à la régulation de la transcription. Le clivage peut intervenir de différentes manières sur ce mécanisme. Il peut en particulier conduire à la dégradation d'un partenaire comme dans le cas d'I κ B qui est dégradé par la voie du protéasome pour permettre la libération et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B (pour revue lire Hacker et Karin, 2006). Il peut également conduire à la libération d'un fragment protéique comme dans le cas de Notch, où, après protéolyse par la gamma-sécrétase suite à la fixation de ligand, un fragment de ce récepteur est transporté dans le noyau pour réguler l'expression génique (De Strooper *et al.*, 1999; Schweisguth, 2004; Struhl et Greenwald, 1999). Le cas rapporté ici fait état de l'augmentation de l'affinité de la protéine ciblée pour l'un de ses partenaires afin d'inhiber sa translocation. A notre connaissance, il s'agit d'un mécanisme qui n'avait pas été préalablement décrit.

Il serait de plus possible que la rétention de CARP au niveau du sarcomère s'accompagne d'une augmentation de sa dégradation. Ce type de mécanisme de régulation est déjà connu pour de nombreux autres facteurs intervenant dans la transcription. Un exemple typique est constitué par le fait que l'exclusion nucléaire du facteur de transcription FoxO1 s'accompagne de son éventuelle dégradation par la voie du protéasome (Matsuzaki *et al.*, 2003). De la même façon, dans le cas de la protéine CARP, le clivage par la calpaïne 3 réduirait sa localisation nucléaire, ce qui pourrait s'accompagner de sa dégradation. Ce phénomène permettrait d'expliquer au moins pour partie l'impossibilité de détecter la protéine CARP en situation physiologique dans le muscle squelettique, bien que l'on sache que son ARNm est exprimé à des niveaux comparables à ceux

observés dans le cœur. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la quantité de protéine CARP ubiquitinée en présence et en absence de calpaïne 3 active, ainsi que son abondance musculaire, voire même sa fonction, en présence d'inhibiteurs du protéasome.

1.2 Fonction(s) de la voie impliquant la calpaïne 3 et CARP

Nos résultats suggèrent que l'activité de la calpaïne 3 pourrait réguler la ou les fonction(s) de CARP. Celles-ci restent à ce jour encore mal connues. Cependant, sa capacité à se lier à l'ADN (Chu *et al.*, 1995) et à réguler négativement le facteur de transcription Yin Yang 1 (YB1) (Zou *et al.*, 1997) sont en accord avec un rôle en tant que régulateur de la transcription génique. L'activation de la voie calpaïne 3/CARP pourrait donc être impliquée dans la régulation de l'expression génique. Nos résultats suggèrent que cette régulation pourrait se faire par le contrôle de la localisation subcellulaire de CARP par la calpaïne 3.

En accord avec cette idée, il a été largement suggéré que la calpaïne 3 pourrait jouer un rôle dans le contrôle de l'expression génique (Baghdiguian *et al.*, 1999; Benayoun *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2006; Ono *et al.*, 2007). En particulier, bien que la démonstration ait été indirecte, notre groupe a précédemment démontré que la calpaïne 3 pourrait réguler l'expression génique de FLIP (Benayoun *et al.*, 2007), un facteur anti-apoptotique dont l'expression est connue pour être sous le contrôle de NF- κ B (Micheau *et al.*, 2001). Il est donc possible que la voie calpaïne 3/CARP intervienne dans la régulation de l'expression de cette protéine, puisque nous avons démontré que CARP inhibe l'activité du facteur NF- κ B. Notre étude mettant en évidence de nombreux autres gènes dont l'expression est régulée par CARP, nous proposons que la calpaïne 3 pourrait également agir sur l'expression de certaines -voire toutes- ces cibles.

L'étude réalisée au cours de cette thèse a permis de mettre en évidence au moins six facteurs de transcription dont l'activité est régulée par CARP : Smad3/4, FREAC2, MEF1, E2F-1, NF- κ B p65 et FoxO1. Nous avons concentré nos efforts sur l'étude des facteurs potentiellement impliqués dans la régulation de la masse musculaire et avons notamment montré que l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B p65 est inhibée par la surexpression de CARP tandis que celle de FoxO1 est stimulée. Un examen de la littérature nous permet d'émettre plusieurs hypothèses concernant le mode de régulation de NF- κ B p65 et FoxO1 par le facteur CARP. De plus, nos résultats expérimentaux suggèrent que CARP, par des mécanismes alliant contrôle de la masse et de la structure musculaire, interviendrait dans la régulation de la plasticité de ce tissu.

1.2.1 Hypothèses sur les mécanismes moléculaires de la régulation génique par CARP

Pour expliquer l'inhibition de NF- κ B par la surexpression de CARP, une première hypothèse est que CARP puisse participer à une voie de signalisation qui régulerait directement l'activité de NF- κ B par phosphorylation et/ou acétylation, puisque l'activité de ce facteur de transcription est connue pour dépendre de ce type de modifications post-traductionnelles (pour revue, lire Perkins, 2006). Il est également possible que la modification de l'activité de liaison à l'ADN de NF- κ B passe par une modification de la quantité de protéines présentes dans le noyau, ce qui pourrait se faire par une régulation de la translocation. Cette régulation pourrait être directe et, tout comme I κ B qui s'associe par ses domaines ankyrin à NF- κ B (Inoue *et al.*, 1992), CARP pourrait interagir avec NF- κ B, entraînant ainsi son inhibition par séquestration dans le cytoplasme. Il est également concevable que cette régulation soit indirecte et fasse appel à un mécanisme actif de translocation de NF- κ B dans le noyau. Ce phénomène pourrait nécessiter l'intervention de protéines dont la régulation de l'expression est sous contrôle de CARP. Parmi celles identifiées dans nos études, deux nous semblent intéressantes de ce point de vue : i) La

protéine Nup214 -dont l'abondance est réduite en présence de CARP- pourrait participer à l'inhibition, puisqu'il a été montré chez la drosophile que Nup214 est indispensable à l'accumulation dans le noyau et à l'activation de certains membres de la famille NF- κ B (Xylourgidis *et al.*, 2006). ii) De même, la diminution de l'expression de Delta-like 1 pourrait également contribuer à l'inhibition de NF- κ B puisque Delta-like 1 est capable, dans les cellules souches mésenchymateuses, d'activer la translocation nucléaire de ce facteur de transcription (Abdallah *et al.*, 2007).

Concernant la protéine FoxO1, il est déjà bien connu que son activité est principalement régulée par des modifications de type phosphorylation et/ou acétylation. Les phénomènes d'acétylation modifient l'activité de liaison à l'ADN de FoxO1 (Daitoku *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005b) et l'état de phosphorylation de FoxO1 permet de contrôler sa mobilité entre le cytoplasme et le noyau (pour revue sur les mécanismes de régulation de FoxO voir Vogt *et al.*, 2005). FoxO1 est ainsi exclu du noyau après phosphorylation de résidus sérine et thréonine par différentes kinases telles que Akt, la kinase dépendante de cycline CDK1, DYRK1A ainsi qu'une kinase encore inconnue stimulée par l'insuline (Guo *et al.*, 1999; Nakae *et al.*, 2000; Rena *et al.*, 2001; Rena *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 1999; Woods *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). Par ailleurs, après phosphorylation par JNK (c-Jun amino-terminal kinase), les membres de la famille FoxO entrent dans le compartiment nucléaire pour y activer l'expression de gènes (Essers *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2005). Bien que l'activité de FoxO1 puisse être régulée directement par le contrôle de sa localisation nucléaire, il reste possible que CARP intervienne dans les mécanismes de modifications post-traductionnelles. Dans ce contexte, il est intéressant de souligner que (i) l'expression de CARP est stimulée dans un modèle diabétique de déficience en insuline (Lehti *et al.*, 2006) où l'activité d'Akt serait réduite (Kobayashi *et al.*, 2005; Laviola *et al.*, 2001), suggérant la possibilité d'une dérégulation de la voie insuline/Akt par CARP (ii) l'expression de CARP varie en fonction de la production de H₂O₂ (Aihara *et al.*, 1999; Aihara *et al.*, 2000b; Jeyaseelan *et al.*, 1997), molécule capable d'activer la voie JNK (Dhar *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1996). Quoiqu'il en soit, la participation de CARP dans les mécanismes de régulation de FoxO par phosphorylation et/ou acétylation reste à démontrer.

Par ailleurs, nos études ont permis de mettre en évidence deux partenaires protéiques, REPS1 et 2, acteurs de la voie de signalisation des GTPases de la famille Ral, voie potentiellement impliquée dans l'atrophie (Ikeda *et al.*, 1998; Penninkhof *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2001). Les expériences de co-immunoprécipitation et co-purification ont confirmé l'existence d'une interaction entre CARP et ces deux membres de la famille des REPS. La voie de signalisation des Ral intervient notamment dans l'activation du facteur de transcription FoxO4 (Essers *et al.*, 2004). Considérant que nos résultats montrent que CARP augmente l'activité d'un des membres de la famille FoxO (FoxO1), il semble très probable que sa liaison avec les protéines REPS1 et REPS2 stimule la voie Ral et, par conséquent, l'activité des facteurs de transcription FoxO. Cependant, les raisons et conséquences physiologiques de cette interaction entre CARP et ses partenaires REPS1 et REPS2 doivent encore être déterminées.

1.2.2 Mécanismes physiologiques régulés par CARP

De nombreux éléments de la littérature suggèrent que CARP pourrait jouer un rôle lors de phénomènes associés à des modifications de la masse musculaire. Dans le cœur, il est classiquement reconnu que CARP jouerait un rôle important dans les mécanismes régulant l'hypertrophie (Aihara *et al.*, 2000a; Arber *et al.*, 1997; Ihara *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2003; Nagueh *et al.*, 2004; Zolk *et al.*, 2002). Dans le muscle squelettique, l'expression de CARP augmente à la fois dans des situations hypertrophiques (Barash *et al.*, 2004; Carson *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2002; Hentzen *et al.*, 2005) et atrophiques (Bakay *et al.*, 2002; Baumeister *et al.*, 1997; Nakada *et al.*, 2003a; Nakada *et al.*, 2003b; Nakamura *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005; Witt *et al.*, 2004), bien que, dans

certaines situations atrophiques, elle soit au contraire réduite (Stevenson *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005a). Dans toutes ces situations, un intense remodelage du sarcomère est observé, suggérant que CARP pourrait être impliqué dans les voies de signalisation contrôlant la plasticité musculaire. Cette hypothèse permettrait d'expliquer les résultats apparemment contradictoires obtenus dans le muscle squelettique.

Ces observations associées à nos résultats permettent de proposer que CARP puisse intervenir dans des conditions de remodelage en contrôlant la régulation génique. Ce rôle pourrait s'exercer lors de différents processus survenant successivement au cours de la vie de la cellule musculaire : lors de la prolifération, phénomène participant au remodelage par l'incorporation de nouvelles cellules dans la fibre, lors des changements qualitatifs tels que les modifications de typage de la fibre ou encore lors de changements quantitatifs impliqués dans le contrôle de la masse musculaire au niveau de l'homéostasie protéique.

- **Régulation de la prolifération cellulaire**

Il avait préalablement été suggéré que CARP puisse intervenir dans la régulation de la prolifération cellulaire (Boengler *et al.*, 2003; de Waard *et al.*, 2003; Kanai *et al.*, 2001). De façon très intéressante, un certain nombre de nos résultats peut être relié à ce processus. En effet, quatre protéines d'intérêt, la culline 3, la cycline non-conventionnelle M2, la nucléosporine Nup214 et delta1, un membre de la voie de signalisation Notch, qui subissent des variations d'expression en présence de CARP, sont connues pour être impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. De plus, nous avons identifié comme partenaire potentiel de CARP, la protéine APPL1, potentiellement impliquée dans la stimulation de la prolifération cellulaire. L'hypothèse que CARP agisse de façon coordonnée afin de permettre le contrôle du cycle cellulaire semble donc être particulièrement intéressante.

La régulation positive de la culline 3, observée en présence de CARP, a été suggérée comme mécanisme permettant de réguler de façon coordonnée le cycle cellulaire (Craig et Tyers, 1999; Du *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1999; Willems *et al.*, 1996). Cette ubiquitine-ligase E3 fait partie du complexe BCR3, lequel participe à l'ubiquitination de la cycline E (Singer *et al.*, 1999), de la cycline D1 (Maeda *et al.*, 2001), ainsi que de Rho-BTB2 (Wilkins *et al.*, 2004), un régulateur du niveau de cycline D1 (Welsh *et al.*, 2001). En dégradant ces trois activateurs de la prolifération cellulaire (Baldin *et al.*, 1993; Coleman *et al.*, 2004; Knoblich *et al.*, 1994), le complexe BCR3 contribuerait à maintenir les cellules dans un état quiescent.

La régulation négative du taux d'expression de la cycline M2 pourrait constituer un niveau supplémentaire de contrôle de la prolifération cellulaire. Cette hypothèse doit cependant être considérée avec précaution, puisque, même si cette protéine est classée dans la famille des cyclines en raison de la présence d'un motif « cyclin-box » dans sa séquence (Wang *et al.*, 2003), sa contribution au niveau du cycle cellulaire n'a jamais été démontrée. Pourtant, en prenant en compte sa localisation nucléaire et la corrélation positive observée entre l'inhibition d'Akt, protéine connue pour induire la prolifération, et la réduction de l'expression de la cycline M2 (Hwang *et al.*, 2005), il est très probable que cette protéine fonctionne réellement comme une cycline.

L'inhibition de l'expression de la nucléosporine Nup214 observée dans les extraits cellulaires surexprimant CARP renforce également l'hypothèse d'un rôle anti-prolifératif de CARP. En effet, sa diminution a été corrélée avec un arrêt du cycle cellulaire, un import nucléaire limité et une accumulation d'ARN messagers dans le noyau (van Deursen *et al.*, 1996).

Le gène Delta-1, connu pour stimuler la prolifération des cellules satellites (Conboy *et al.*, 2003; Conboy et Rando, 2005; Miller et Emerson, 2003) et de nombreux autres types cellulaires dont les cellules souches

hématopoétiques (Karanu *et al.*, 2001) et les lymphocytes T (Lehar *et al.*, 2005) par exemple, est régulé négativement en présence de CARP.

Enfin, l'interaction entre CARP et APPL1 pourrait réguler le cycle cellulaire, puisque APPL1 s'associe avec la petite GTPase Rab5 pour inhiber la prolifération cellulaire (Miaczynska *et al.*, 2004), et que l'inhibition d'APPL1 supprime l'activation d'Akt (Saito *et al.*, 2007), une kinase connue pour son rôle prolifératif (Ahmed *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2004; Muise-Helmericks *et al.*, 1998; Rossig *et al.*, 2001; Stabile *et al.*, 2003).

L'hypothèse d'une relation entre CARP et cycle cellulaire est confortée par le fait que quatre des six facteurs de transcription identifiés dans notre étude, FoxO1, NF-κB p65, Smad3 et E2F-1, sont bien connus pour influencer le cycle cellulaire, notamment en régulant le niveau de plusieurs cyclines : FoxO1 et Smad3 sont des inhibiteurs de la prolifération cellulaire (Matsuura *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1998) tandis que NF-κB p65 et E2F-1 sont des activateurs de ce processus (Guttridge *et al.*, 1999) (pour une revue sur le rôle de E2F-1, voir Chaussepied et Ginsberg, 2005). FoxO1 régule négativement la cycline D2 (Park *et al.*, 2005) et stimule la cycline non-conventionnelle G2 (Modur *et al.*, 2002) qui, contrairement aux cyclines classiques, inhibe la progression du cycle cellulaire (Bennin *et al.*, 2002). De plus, FoxO1 stimule deux inhibiteurs de la prolifération cellulaire, p27^{Kip1} (Machida *et al.*, 2003; Rathbone *et al.*, 2008) et, en association avec Smad3, p21^{Cip1} (Seoane *et al.*, 2004). NF-κB régule positivement la cycline B1 (Hinata *et al.*, 2003), la cycline D1 (Guttridge *et al.*, 1999; Takebayashi *et al.*, 2003) et la cycline H (Hinata *et al.*, 2003). Si on considère leurs effets sur les cyclines, on peut s'attendre à ce que l'activation de FoxO1 associée à l'inhibition de NF-κB et d'E2F-1 régule négativement la prolifération cellulaire. Enfin, la surexpression de CARP à l'aide d'un vecteur adénoviral induit une augmentation de l'expression de p21^{WAF1/CTP1} (Kanai *et al.*, 2001), un inhibiteur du cycle cellulaire.

Les modifications observées, après surexpression de CARP, au niveau de l'activité des facteurs de transcription ainsi que dans le profil d'expression de certaines protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire semblent donc converger pour suggérer l'hypothèse d'un effet anti-prolifératif de la protéine CARP (figure 1). Dans le muscle squelettique, elle pourrait donc jouer un rôle actif dans le maintien ou le retour en quiescence des cellules satellites.

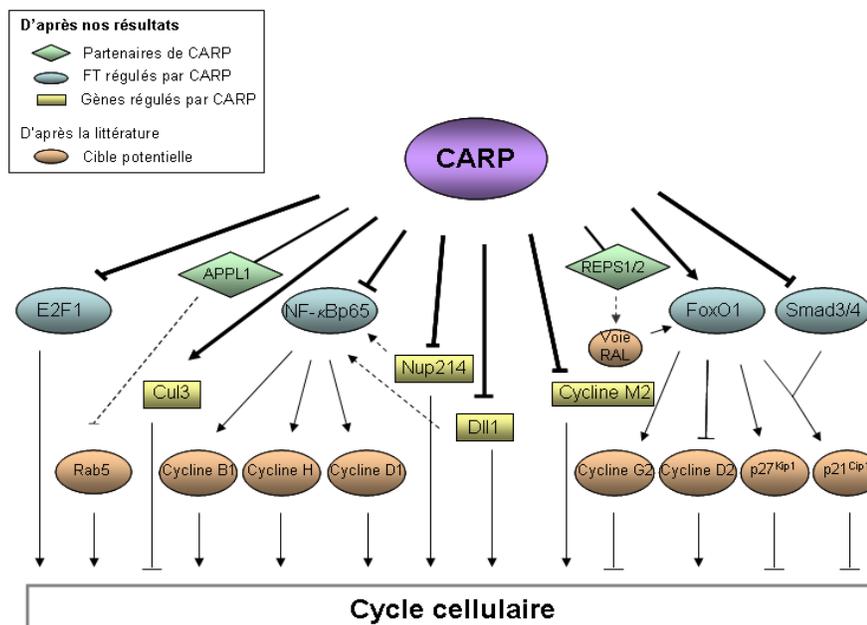


Figure 1 : Rôle présumé de CARP dans la régulation du cycle cellulaire

- **Contrôle des changements qualitatifs de la fibre**

Il a déjà été suggéré que CARP puisse participer au contrôle de la structure du muscle par la régulation de l'expression génique : 1) l'expression des chaînes légères de myosines spécifiques du ventricule cardiaque est inhibée par la liaison de CARP au facteur Ybox Binding protein 1 (YB1) (Zou *et al.*, 1997) ; 2) l'expression d'une isoforme plus longue de la titine serait responsable de l'augmentation de la longueur des sarcomères observée dans le modèle murin déficient pour les trois isoformes de la famille des MARP (dont CARP) (Barash *et al.*, 2007).

Parmi les partenaires potentiels de CARP mis en évidence dans notre étude, beaucoup sont des protéines de structure: la titine est l'une des protéines majeures composant les myofibrilles (Granzier et Labeit, 2005; Wang *et al.*, 1979), la myoméline 2 fait partie des constituants de la ligne M (Lange *et al.*, 2005a; Obermann *et al.*, 1996; Obermann *et al.*, 1997), MYL1 est une isoforme des chaînes légères de myosine spécifique des fibres rapides (Cohen-Haguenauer *et al.*, 1988), et MYBPC1 participe non-seulement à l'architecture du sarcomère mais également à la régulation de la contraction musculaire (Squire *et al.*, 2003). De surcroît, la protéine CARP est connue pour s'associer à l'extrémité amino-terminale de la myopalladine et à la titine dans sa région N2A (Bang *et al.*, 2001b; Miller *et al.*, 2003). Ces données suggèrent fortement l'existence d'une relation entre CARP et la structure du sarcomère. Toutefois, il reste à démontrer si une régulation génique par l'intermédiaire de CARP pourrait contribuer à la régulation de la structure. Considérant la participation de CARP dans le contrôle de l'activité du facteur FoxO1, cette hypothèse semble probable. En effet, la stimulation de l'activité de FoxO1 pourrait contribuer à la diminution du nombre de fibres lentes que nous avons observée lors de nos expériences de surexpression de CARP, puisqu'une réduction du nombre de ce type de fibres a également été constatée chez les souris transgéniques surexprimant FoxO1 (Kamei *et al.*, 2004). Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec les résultats, quoique non-significatifs, de Barash et collaborateurs qui montrent une augmentation du nombre de fibres lentes dans le modèle déficient pour les trois protéines de la famille des MARP (Barash *et al.*, 2007). De telles régulations, et plus précisément une transition des fibres de type lent vers le type rapide, sont décrites pour survenir lors de conditions de dénervation, d'immobilisation ou d'inactivité du muscle (pour revue consulter Zhang *et al.*, 2007), suggérant que CARP serait impliqué dans le maintien ou dans le retour à un état de repos des fibres musculaires. Ceci paraît tout à fait compatible avec le rôle anti-prolifératif proposé précédemment.

- **Contrôle de l'homéostasie protéique**

Comme déjà évoqué, l'activité transcriptionnelle de FoxO1 et NF- κ B p65, deux facteurs impliqués dans la diminution de masse musculaire, est régulée par CARP, suggérant que CARP puisse jouer un rôle au cours de ce phénomène. Sous certaines conditions atrophiques, FoxO1 stimule l'expression de MuRF1 et de MAFbx (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004) et NF- κ B p65 celle de MuRF1 (Cai *et al.*, 2004). Pour rappel, MuRF1 et MAFbx sont deux ubiquitine-ligases E3 surexprimées lors de nombreuses situations associées à une diminution de la masse musculaire (Bodine *et al.*, 2001a; Clavel *et al.*, 2006; Di Giovanni *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2004; Krawiec *et al.*, 2005; Latres *et al.*, 2005; Lecker *et al.*, 2004; Leger *et al.*, 2006; Sacheck *et al.*, 2007) ou lors de conditions d'activation de la protéolyse (Dehoux *et al.*, 2004; Dehoux *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Wray *et al.*, 2003). De façon inattendue, dans nos expériences, bien que la surexpression de CARP régule l'activité des facteurs FoxO1 et NF- κ B p65, elle n'entraîne pas l'augmentation de MuRF1 ou de MAFbx. Cette observation semble toutefois en accord avec les données de la littérature ainsi qu'avec nos résultats. En effet, la régulation positive de CARP dans le muscle squelettique lors de situations hypertrophiques aussi bien qu'atrophiques et l'absence de processus atrophique consécutivement à la surexpression de CARP dans nos

expériences suggèrent que CARP ne serait pas impliqué directement dans le développement de l'atrophie. Finalement il semble que FoxO1, après activation de la voie impliquant CARP, jouerait un rôle à un autre niveau que l'atrophie *stricto sensu* et agirait sur des cibles différentes de MAFbx et MuRF1.

Lors de notre expérience de surexpression de CARP dans les muscles de souris, nous n'avons pas constaté d'effet notable sur le poids des muscles ou sur la taille des fibres musculaires. Il est possible que nos conditions de surexpression soient inadéquates, puisque la présence de l'étiquette eYFP fusionnée à la protéine CARP pourrait affecter sa conformation et son action sur ses cibles ou ses partenaires. D'autre part, si on considère que le niveau d'expression obtenu et la durée de notre expérience reproduisent fidèlement ceux nécessaires à la mise en place de l'atrophie par dénervation, nos conditions expérimentales devraient être suffisantes pour entraîner une atrophie. Cependant, l'atrophie induite après dénervation est un mécanisme complexe, et on ne peut en aucun cas s'attendre à ce que CARP puisse reproduire à lui seul ses effets sur la masse musculaire. Ces considérations prises en compte, nos résultats semblent néanmoins suggérer que CARP ne serait pas capable d'initier l'atrophie. De surcroît, nos expériences d'inhibition de l'expression de CARP par interférence ARN au cours de la dénervation ne préviennent pas la perte musculaire, semblant confirmer cette conclusion.

- **Rôle potentiel dans le contrôle du remodelage**

Au cours de notre étude, nous avons observé que l'expression de CARP est régulée différemment au cours des processus mis en place lors de la dénervation transitoire et de la dénervation définitive. En effet, la quantité d'ARNm de CARP reste très élevée 21 jours après dénervation définitive, alors qu'elle revient à son niveau basal dans le cas de la dénervation transitoire. D'autre part, lors de notre criblage des gènes régulés en présence de CARP, nous avons mis en évidence davantage de régulations négatives que de régulations positives. De même, concernant le rôle de CARP dans la régulation transcriptionnelle, ses effets décrits dans la littérature sont plutôt des effets inhibiteurs (Zou *et al.*, 1997). Ces données confortent donc de nouveau l'hypothèse d'une participation active de CARP dans le maintien de la fibre dans un état de repos. Son activité pourrait ainsi être essentielle dans des conditions où elle permettrait de prévenir l'expression de certains gènes et de ralentir la prolifération. Dans ce contexte, les différences observées entre les deux modes de dénervation quant au niveau d'expression de CARP seraient compatibles avec notre postulat puisque l'expression de CARP se maintient dans le cas où l'atrophie persiste. De plus, l'augmentation de l'expression de CARP dans ces situations et son effet négatif sur la quantité de fibres lentes sont également en accord avec la diminution de ce type de fibres précédemment observée au cours de la dénervation (Zhang *et al.*, 2007).

1.2.3 Activation de la voie calpaïne 3/CARP

Les données de la littérature et nos résultats convergent pour suggérer que la protéine CARP pourrait contribuer au maintien de la structure du sarcomère, et donc à la régulation de la plasticité musculaire (figure 2).

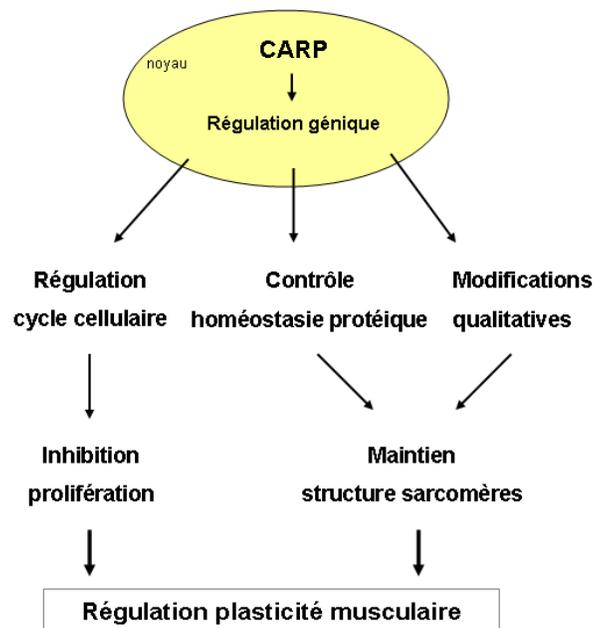


Figure 2 : Rôle supposé de CARP dans la plasticité musculaire

Par l'intermédiaire de son action sur CARP, la calpaïne 3 pourrait ainsi jouer un rôle dans ce processus biologique, rôle qui serait nécessaire pour que le remodelage puisse être effectué. Cette hypothèse a été préalablement suggérée suite à plusieurs observations. En effet, de nombreux éléments de la littérature suggèrent que la calpaïne 3 pourrait être impliquée dans le contrôle de la structure de la fibre par clivage de protéines du cytosquelette et des adhésions focales (Cohen *et al.*, 2006; Guyon *et al.*, 2003; Ono *et al.*, 2007; Taveau *et al.*, 2003), les clivages étant une condition sans laquelle un remodelage ne peut être effectué. D'autres études suggèrent qu'elle pourrait participer à la régulation de l'homéostasie protéique en intervenant en amont du système ubiquitine-protéasome (Kramerova *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2007). Il a notamment été proposé que la calpaïne 3 soit nécessaire pour l'élimination, par la voie du protéasome, de protéines endommagées ou spécifiques de l'atrophie, puisque son absence est associée à une diminution de la quantité de protéines ubiquitinées et à un défaut de remodelage dans un modèle de remodelage induit par suspension (Kramerova *et al.*, 2005). Nos études permettent donc de poser des éléments moléculaires sur cette hypothèse et de suggérer les voies de signalisation potentiellement impliquées.

Une question primordiale se pose donc suite à toutes ces considérations : dans quelles circonstances peut être nécessaire l'activation de la voie conduisant à une réduction de CARP au niveau nucléaire et impliquant la calpaïne 3 ? Il est possible que l'activation de la calpaïne 3 soit requise lorsqu'il est nécessaire de supprimer les effets de CARP au sein du noyau, plus précisément lors de situations où il est indispensable de stimuler la prolifération et d'activer la transcription de certains gènes inhibés par CARP. De tels événements pourraient notamment survenir après réception de signaux mécaniques. La calpaïne 3 étant localisée sur le sarcomère de la fibre (Kinbara *et al.*, 1997; Sorimachi *et al.*, 1995; Taveau *et al.*, 2003), les signaux de ce type semblent particulièrement pertinents.

En particulier, l'étirement du muscle pourrait permettre d'activer la voie de la calpaïne 3, puisqu'on trouve dans la région N2A de la titine, des éléments structuraux responsables des propriétés élastiques du sarcomère. Lorsque le muscle est étiré, les domaines immunoglobulines sont recrutés les uns après les autres et, si une

tension plus importante est appliquée, le segment PEVK participe à son tour (Linke *et al.*, 1998). Une hypothèse séduisante serait que les modifications de structure de la région N2A pourraient entraîner le détachement et l'activation rapide et transitoire de la calpaïne 3. Des observations faites sur un modèle murin, la souris *mdm*, apportent des éléments en faveur de cette hypothèse. Ce modèle est caractérisé par une mutation dans le site de liaison de la calpaïne 3 sur la titine en N2A et un phénotype atrophique (Garvey *et al.*, 2002). Il a été montré que la calpaïne 3 reste capable d'être activée *in vitro* (Milic *et al.*, 2007) et que le muscle de ces souris présentent une réduction secondaire de la calpaïne 3 (Garvey *et al.*, 2002; Haravuori *et al.*, 2001), suggérant que, une fois libérée de ses contraintes, la calpaïne 3 serait activée de façon constitutive et rapidement dégradée. Il est donc tout à fait possible que l'étirement du sarcomère dans la région N2A soit un signal déclenchant sa libération et son activation. Par ailleurs, d'autres études suggèrent que la contraction excentrique serait un signal d'activation de la calpaïne 3 (Murphy *et al.*, 2007), et stimulerait l'expression de la protéine CARP (Barash *et al.*, 2007; Barash *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2002; Hentzen *et al.*, 2005; Mahoney *et al.*, 2008).

Deux types de signaux d'activation mécaniques semblent donc capables de réguler l'activité de la calpaïne 3 et agir sur la voie calpaïne3/CARP : l'étirement du muscle et la contraction excentrique. L'exercice concentrique, quant à lui, a été rapporté comme n'induisant pas l'activation de la calpaïne 3 (Murphy *et al.*, 2006). Il semble donc que la calpaïne 3 puisse, en réponse à un signal d'activation mécanique, passer d'un état inactif à un état actif, orchestrant un remodelage de la fibre musculaire. Son action sur CARP permettrait de lever l'inhibition coordonnée par cette protéine au niveau de la quiescence des cellules satellites et du maintien des sarcomères.

1.2.4 Conclusion

En résumé, au cours de cette étude, nous avons démontré l'existence d'une voie de signalisation impliquant la calpaïne 3 et la protéine CARP (figure 3). Nous proposons que, après réception d'un signal de type mécanique au niveau de la région N2A, la calpaïne 3 soit activée et clive le facteur de régulation de la transcription CARP. Son affinité pour la région N2A serait alors augmentée et, par voie de conséquence, ses effets sur la régulation génique réduits. Nous avons démontré que CARP pourrait jouer un rôle dans le mécanisme de remodelage musculaire en contrôlant la prolifération et l'architecture musculaires. Ces phénomènes seraient modulés en présence de calpaïne 3. La perte de ces phénomènes de régulation génique permettrait d'expliquer au moins pour partie la diminution de la masse musculaire observée chez les souris déficientes en calpaïne 3 et chez les patients atteints de LGMD2A. En effet, chez ses patients, l'activité de la calpaïne 3 faisant défaut, CARP pourrait avoir un effet négatif sur les processus de régénération se produisant en réponse à tout traumatisme subit par la fibre musculaire et donc un effet délétère sur le long terme.

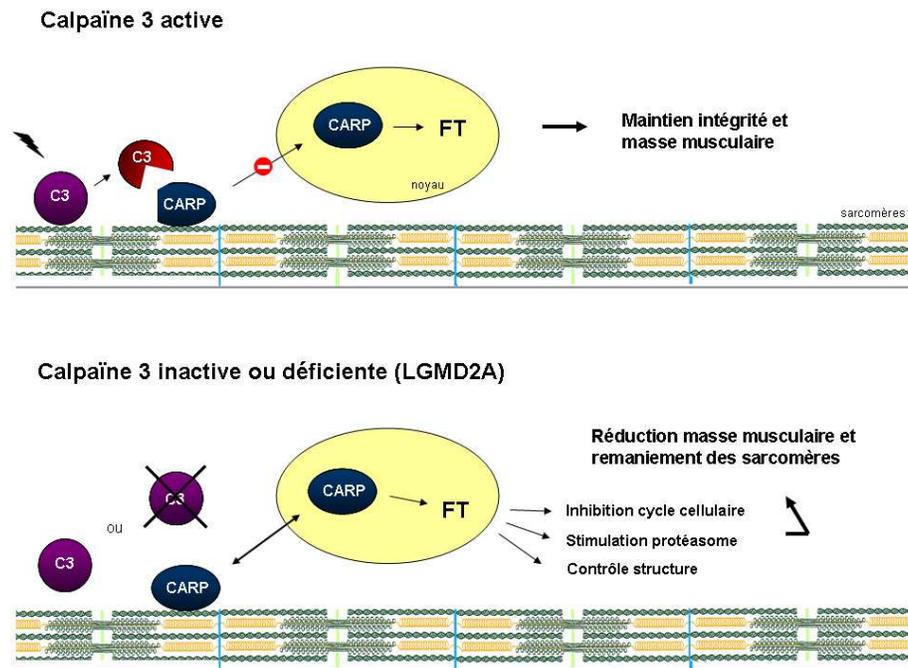


Figure 3 : Modèle des voies de signalisation impliquant CARP et la calpaïne 3

La description de la relation fonctionnelle entre la calpaïne 3 et la protéine CARP a permis de mettre en évidence le rôle inhibiteur de la calpaïne 3 sur la fonction de ce régulateur de la transcription. En absence de calpaïne 3, les activités physiologiques de CARP seraient donc exacerbées. L'inhibition de CARP pourrait alors être envisagée comme nouvelle solution thérapeutique pour combattre la LGMD2A.

2 Physiopathologie musculaire et approches thérapeutiques

La première partie de notre étude a permis de mettre en évidence le rôle de la voie calpaïne 3/CARP dans le contrôle de la plasticité musculaire. Nous avons également proposé que la dérégulation de cette voie puisse participer au développement de la LGMD2A. De façon tout à fait intéressante, de nombreuses études ont montré que diverses pathologies musculaires sont associées à une augmentation de l'expression de CARP dans le tissu squelettique (Bakay *et al.*, 2002; Nakada *et al.*, 2003a; Nakada *et al.*, 2003b; Nakamura *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2005; Wenzel *et al.*, 2007). Un des facteurs communs à toutes ces maladies est l'alternance de cycles de nécrose-régénération, ce qui suggère que la protéine CARP pourrait jouer un rôle dans le remaniement dystrophique. Afin de préciser ce rôle, les voies potentiellement impliquées dans la plasticité musculaire ont été explorées dans différents modèles murins. Nos études ont permis de confirmer que l'expression de CARP est généralement augmentée dans les dystrophies musculaires, et de mettre en évidence un marqueur (FoxO1) surexprimé spécifiquement dans le modèle animal reproduisant la LGMD2A. La documentation des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans ce contexte nous permet de proposer plusieurs nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces maladies.

2.1 Rôle de CARP dans la physiopathologie des pathologies musculaires

Le niveau d'expression de CARP a été étudié dans les muscles de différents modèles murins de dystrophie ou d'atrophie musculaires. Nous avons ainsi montré une régulation positive de cette protéine dans les

muscles des modèles dystrophiques *mdx*^{4Cv}, *C3-null* et *Sgca-null*, ainsi que dans des modèles d'atrophie induite par une dénervation ou un jeûne prolongé. Cette observation s'ajoute et renforce ce qui a déjà été rapporté dans le cas de nombreuses maladies neuromusculaires [la dystrophie musculaire de Duchenne (Bakay *et al.*, 2002; Nakada *et al.*, 2003b), plusieurs myopathies congénitales (Nakada *et al.*, 2003a), l'atrophie musculaire spinale (Nakada *et al.*, 2003a), la sclérose amyotrophique latérale (Nakamura *et al.*, 2002), une LGMD non-caractérisée (Nakada *et al.*, 2003b), la dystrophie musculaire Fascio-Scapulo-Humérale (Nakada *et al.*, 2003b), la déficience en laminine $\alpha 2$ (Nakada *et al.*, 2003b), les modèles murins *mdx* (Porter *et al.*, 2002), SJL (Suzuki *et al.*, 2005) et *mdm* (Witt *et al.*, 2004)] et dans des conditions d'atrophie induite par une dénervation (Baumeister *et al.*, 1997; Nakada *et al.*, 2003a; Tsukamoto *et al.*, 2002). Les raisons pour lesquelles l'expression de CARP est stimulée dans toutes ces conditions ne sont cependant pas clairement définies.

Dans certaines pathologies musculaires, l'expression de plusieurs cytokines, notamment le $TNF\alpha$ et l'IL1 α et/ou β est exacerbée (Kumar et Boriek, 2003; Lundberg et Nyberg, 1998; Mackiewicz *et al.*, 2003; Moldawer et Copeland, 1997; Spate et Schulze, 2004; Tews et Goebel, 1996; Wolf et Baethge, 1990). Il a été préalablement rapporté que certaines de ces cytokines pouvaient stimuler l'expression de CARP dans des cellules en culture (Chu *et al.*, 1995). Par ailleurs, le profil d'expression de CARP semble suivre les niveaux de $TNF\alpha$ (Ruohonen *et al.*, 2005) et d'IL1 β mesurés au cours de la dénervation (Kurek *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 2003). Il semble donc que l'expression élevée de CARP observée dans les dystrophies musculaires, et en particulier dans les muscles des animaux *Sgca-null* et *mdx*^{4Cv}, deux modèles présentant les signes d'une nécrose particulièrement importante, puisse refléter le taux élevé de ces cytokines dans le muscle. L'inflammation étant connue pour participer à la nécrose des fibres musculaires, on peut se demander quelle peut être l'implication de CARP dans ce phénomène. Il serait donc intéressant d'examiner plus précisément les effets de la surexpression de CARP dans le muscle et de déterminer si cette surexpression pourrait être à l'origine de l'apparition de signes nécrotiques.

Au niveau mécanistique, nous avons présenté précédemment que CARP pourrait contribuer à l'inhibition de la prolifération cellulaire. D'après nos résultats (discutés précédemment), la protéine CARP pourrait réguler l'activité d'un certain nombre de facteurs de transcription et moduler l'expression de différents acteurs du cycle cellulaire, induisant de fait une inhibition de la prolifération cellulaire. Ces résultats sont accord avec l'abondante littérature concernant le rôle négatif de CARP sur la régénération musculaire (Kanai *et al.*, 2001). Il apparaît donc très probable que l'augmentation de l'expression de CARP soit plutôt néfaste pour le muscle. Il est possible que ce processus soit sous stimulation de la voie $TGF\beta/p21^{WAF1/CTP1}$ dans le muscle, puisque qu'il a été montré que le $TGF\beta$ induit l'expression de CARP et qu'il en résulte une augmentation du niveau d'expression p21 associée à une diminution de la synthèse d'ADN (Boengler *et al.*, 2003; de Waard *et al.*, 2003; Kanai *et al.*, 2001; Labbe *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2005a). En accord avec cette hypothèse, le niveau de CARP et de sa cible p21 évoluent parallèlement à la masse du muscle et à la prolifération cellulaire durant nos expériences de dénervation (McGeachie, 1989). Il faut noter que l'expression de CARP et p21 est aussi particulièrement élevée dans les deux modèles hautement régénératifs α -sarcoglycane et *mdx*^{4Cv}, comme préalablement observé par Bakay et collaborateurs (Bakay *et al.*, 2002). Cette observation va donc à l'encontre de l'hypothèse d'un mécanisme physiopathologique lié à CARP par un contrôle négatif de la prolifération. Nous pouvons alors imaginer que la participation de CARP serait plutôt liée à une inhibition du remodelage, phénomène d'autant plus délétère dans une situation très régénérative (figure 4).

Finalement, quelle que soit la voie dans laquelle CARP est impliqué, il n'est pas encore clairement défini si la surexpression de CARP facilite le développement de la maladie ou si elle permet d'en limiter les conséquences. Concernant les modèles de dystrophies musculaires, une étude plus complète du niveau

d'expression de CARP en fonction de l'âge des animaux pourrait aider à éclaircir ce point. Quoi qu'il en soit, le facteur CARP pourrait représenter une cible intéressante pour l'élaboration de solutions thérapeutiques dans le cadre des dystrophies musculaires.

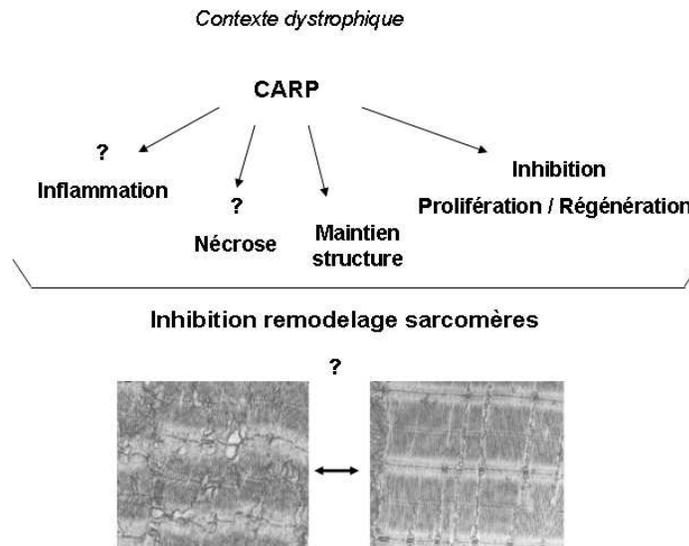


Figure 4 : Rôle putatif de CARP dans la physiopathologie des dystrophies musculaires

2.2 Rôle de FoxO1 dans la physiopathologie de la LGMD2A

Au cours de l'étude réalisée à partir des muscles des différents modèles murins de dystrophies musculaires, nous avons mis en évidence une stimulation significative de l'expression de FoxO1 dans tous les muscles du modèle *C3-null* considérés. Cette observation est particulièrement intéressante d'autant plus que FoxO1 semble plutôt diminuer dans les autres modèles. Ce résultat suggère donc un lien particulier entre la calpaïne 3 et FoxO1, que ce soit par une régulation de son expression ou par réaction à un mécanisme physiopathologique présent spécifiquement en cas de déficience en calpaïne 3. En l'absence de calpaïne 3, l'expression du facteur FoxO1 pourrait ainsi être dérégulée.

Il serait donc possible que la calpaïne 3, en plus d'être capable, par l'intermédiaire de son action sur CARP, d'inhiber l'activité de liaison à l'ADN de FoxO1, puisse également contrôler ce facteur de transcription par inhibition de son expression. La régulation génique supposée de la calpaïne 3 pouvant éventuellement passer par CARP, ceci suggère un modèle de régulation complexe faisant participer ces trois partenaires.

Une autre hypothèse supposerait que le mécanisme physiopathologique présent spécifiquement en cas de déficience en calpaïne 3 permettrait de réguler indirectement l'expression de FoxO1. En effet, cette situation pathologique pourrait entraîner des signaux spécifiques qui, par une cascade de signalisation, activeraient l'expression de FoxO1. Ceci suggère qu'il pourrait exister un profil de cytokines spécifique de la LGMD2A. Dans ce contexte, il est intéressant de souligner que des infiltrats inflammatoires éosinophiles ont été observés dans un certain nombre de cas de LGMD2A (Krahn *et al.*, 2006).

Signalons d'autre part que le modèle déficient en calpaïne 3 est particulièrement atrophique comparé aux autres modèles. Ceci pourrait s'expliquer, au moins en partie, par le contrôle positif de FoxO1, facteur connu pour ses effets négatifs sur la masse musculaire (Kamei *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2004). En effet, il est notamment décrit pour contribuer à la dégradation des protéines par la voie du protéasome en stimulant l'expression des ubiquitine-ligases E3 MuRF1 et MAFbx (Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004). De façon particulièrement intéressante, nos résultats permettent d'exclure le ciblage de ces deux enzymes par FoxO1 dans le modèle LGMD2A suggérant qu'elles ne participeraient pas aux mécanismes atrophiques dans cette situation. FoxO1 pourrait être impliqué dans le processus atrophique, en intervenant sur une autre voie, comme celles du lysosome et de l'autophagie, ou encore par l'intermédiaire du cycle cellulaire. En effet, de façon intéressante, chez les souris transgéniques surexprimant FoxO1, il n'a pas été observé de régulation positive des facteurs MuRF1 et MAFbx (Kamei *et al.*, 2004), mais une augmentation de l'expression de la cathepsine L (Kamei *et al.*, 2004), une protéase lysosomale impliquée dans la dégradation des protéines et l'atrophie musculaire (Bechet *et al.*, 2005), et une diminution de l'expression de deux protéines hypertrophiantes : IGF-BP5 (Schneider *et al.*, 2002) et mTOR (Kamei *et al.*, 2004; Southgate *et al.*, 2007). Il a d'ailleurs été montré récemment qu'un membre de la famille des facteurs FoxO -FoxO3- pouvait augmenter la dégradation des protéines musculaires par le lysosome en stimulant l'autophagie (Zhao *et al.*, 2007). Cependant, tandis que l'activité des cathepsines semble rester stable, l'expression de la cathepsine L est réduite dans les muscles d'un modèle murin déficient en calpaïne 3 (Combaret *et al.*, 2003). Ceci n'exclut toutefois pas une possibilité de participation du système lysosomal dans la physiopathologie LGMD2A. On ne peut pas exclure non plus une participation de l'autophagie, puisque la famille de facteurs FoxO a été précédemment reliée à cette voie (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Une étude plus approfondie des voies autophagiques et hypertrophiques chez les animaux déficients en calpaïne 3 apparaît comme indispensable pour mieux comprendre le rôle de FoxO1 dans le développement de l'atrophie dans le contexte de la LGMD2A (figure 5).

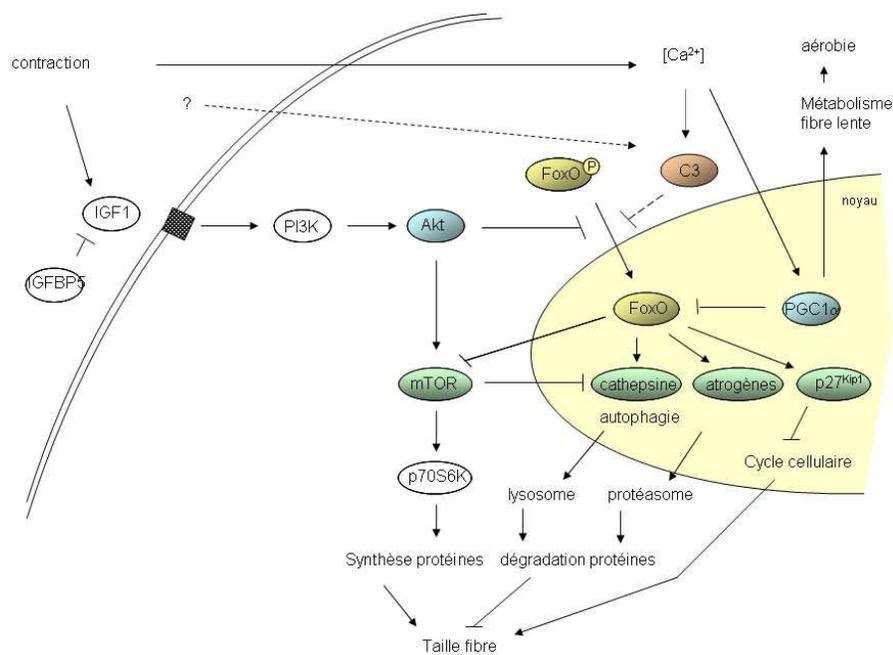


Figure 5 : Rôle supposé de FoxO1 dans la physiopathologie de la LGMD2A

2.3 Approches thérapeutiques

Prenant en compte le mode de transmission de la maladie, les fonctions des protéines impliquées, les conséquences de la pathologie et ce qu'on connaît des mécanismes physiopathologiques, plusieurs stratégies à visée thérapeutique ont été imaginées et/ou testées dans les modèles animaux de dystrophies musculaires des ceintures (pour revue récente consulter Danièle *et al.*, 2007).

Les formes récessives entraînant une diminution de la quantité d'une protéine ou l'expression d'une protéine non fonctionnelle, la stratégie de transfert de gène ou de greffe de cellules normales ou corrigées génétiquement semble la plus appropriée. L'utilisation de « vecteurs de gènes thérapeutiques » a déjà montré des résultats prometteurs dans le cas des LGMD2A, C, D, E et F (Allamand *et al.*, 2000; Bartoli *et al.*, 2006a; Bartoli *et al.*, 2006b; Bartoli *et al.*, 2006c; Cordier *et al.*, 2000; Dressman *et al.*, 2002; Fougerousse *et al.*, 2007; Greulich *et al.*, 1999; Holt *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005). Moins nombreuses, d'autres études rapportent que l'injection de cellules souches d'origines variées (cellules souches du sang de cordon ou mésoangioblastes) pourrait être bénéfique dans le cas des LGMD2B et D (Galvez *et al.*, 2006; Guttinger *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2004; Sampaolesi *et al.*, 2003). Ces deux types d'approches nécessitent cependant d'être encore améliorées, notamment pour augmenter l'efficacité du transfert de gène (notamment en reconsidérant les sérotypes d'AAV et les promoteurs utilisés) et limiter la réponse immunitaire dirigée contre le transgène, contre le vecteur lui-même ou, dans le cas de la thérapie cellulaire, contre les cellules greffées.

De façon extrêmement intéressante, les approches de type pharmacologique pourraient permettre de traiter un spectre plus large de LGMD. Basées sur la compensation de la fonction de la protéine déficiente, sur le blocage des mécanismes physiopathologiques, ou encore sur l'augmentation de la masse musculaire, certaines stratégies se sont récemment révélées encourageantes. Ainsi, l'inhibition de l'activité du protéasome dans le cas de la LGMD1C (Galbiati *et al.*, 2000), le blocage de l'activation du complément dans le cas de la LGMD2B (Wenzel *et al.*, 2005), l'inhibition de la mannosidase I dans le cas de la LGMD2D (Bartoli *et al.*, 2008) et de façon plus générale, l'inhibition des calpaïnes ubiquitaires (Bartoli *et al.*, 2006a) et du transport du calcium pour les sarcoglycanopathies (Iwata *et al.*, 2005) semblent être des pistes intéressantes. Les approches visant à augmenter la masse musculaire sont potentiellement capables de traiter les symptômes d'un plus grand nombre de dystrophies. A l'heure actuelle, l'approche la plus développée est basée sur l'inhibition des effets d'une cytokine connue pour activer des voies intracellulaires inhibitrices de la croissance musculaire, la myostatine (McPherron *et al.*, 1997). La masse musculaire des souris déficientes en δ -sarcoglycane (modèle LGMD2F) augmente après leur croisement avec des souris déficientes en myostatine, ce qui constitue une preuve de principe de la faisabilité de cette approche pour les LGMD (Parsons *et al.*, 2006). L'utilisation d'un anticorps bloquant la myostatine a permis d'augmenter la masse et la force musculaires chez les souris déficientes en γ -sarcoglycane (modèle LGMD2C) (Bogdanovich *et al.*, 2007). D'autre part, la surexpression du propeptide de la myostatine -son inhibiteur endogène- a montré une amélioration du phénotype dystrophique et de la force musculaire chez des souris déficientes en calpaïne 3 et cavéoline 3 (modèles LGMD2A et 1C respectivement) (Bartoli *et al.*, 2007; Ohsawa *et al.*, 2006).

Au cours de cette étude, les résultats obtenus permettent de proposer deux nouvelles cibles particulièrement intéressantes pour l'élaboration de solutions thérapeutiques de type pharmacologique: FoxO1 et CARP. L'inhibition de l'expression et/ou de l'activité de FoxO1 pourrait permettre d'améliorer le phénotype de la LGMD2A. Plusieurs méthodes pourraient être envisagées pour atteindre cet objectif : (i) identifier des molécules capables de bloquer des sites d'activation de la transcription sur le promoteur de FoxO1 et de diminuer ainsi son expression, (ii) utiliser la stratégie d'interférence ARN pour diminuer la quantité de FoxO1 synthétisée, ou encore

(iii) réguler positivement la protéine PGC1 α -un inhibiteur naturel de FoxO1, en stimulant son expression ou en la surexprimant par transfert de gène.

De façon encore plus intéressante, la régulation de l'expression de CARP pourrait être bénéfique pour l'ensemble des LGMD, voire même pour d'autres pathologies musculaires. Il va donc être particulièrement intéressant d'étudier les effets de l'expression de notre vecteur AAV-shRNA-CARP dans les muscles des différents modèles dystrophiques dont nous disposons au laboratoire. D'autre part, considérant que le TGF β , le TNF α et l'IL1 α sont des stimuli connus pour activer l'expression de CARP, cibler ces voies grâce à des molécules pharmacologiques semble une alternative d'intérêt. Il a d'ailleurs été rapporté que l'inhibition des voies de signalisation induites par le TNF α grâce au « Remicade » (Grounds *et al.*, 2005; Grounds et Torrisi, 2004) et à l'« Etanercept » (Hodgetts *et al.*, 2006) ou par le TGF β grâce au « losartan » (Cohn *et al.*, 2007) pouvait prévenir la nécrose et être bénéfique pour les muscles du modèle *mdx*, sur le plan histologique et/ou fonctionnel. L'inhibition de la voie de la myostatine -une protéine de la famille des facteurs de croissance TGF β - pourrait également permettre de réguler indirectement l'expression de CARP. Cependant, l'augmentation de la masse musculaire n'est pas toujours associée à une amélioration de la force et peut avoir des conséquences métaboliques non désirées (Amthor *et al.*, 2007). De plus, le traitement n'est parfois efficace que si les sujets traités sont très jeunes (Parsons *et al.*, 2006). L'expression de CARP étant sous la dépendance d'un autre membre de la famille TGF β , l'inhibition spécifique de cette voie pourrait permettre d'éviter ces effets indésirables. Nous avons d'ores et déjà développé un système cellulaire exprimant le promoteur de CARP en amont d'un gène rapporteur afin de réaliser un criblage des molécules capables de réguler la transcription de CARP. Le traitement des muscles par les molécules ainsi identifiées, seules ou en association avec d'autres stratégies thérapeutiques, pourront très probablement permettre la mise au point de nouveaux traitements pour ces maladies gravement invalidantes.

3 Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que la calpaïne 3 pouvait jouer un rôle dans le contrôle de l'expression génique, en régulant notamment une voie de signalisation dont un acteur est le facteur CARP. Ces régulations, potentiellement impliquées dans la plasticité de la fibre, seraient déficientes dans la LGMD2A et participeraient à la mise en place du phénotype. La compensation de cette voie dans cette maladie pourrait donc permettre de réduire, au moins pour partie, la dystrophie musculaire.

L'expression de CARP ayant également été rapportée comme étant augmentée dans diverses pathologies musculaires, nous avons testé l'hypothèse et démontré que cette protéine est également un marqueur des dystrophies musculaires au sens large. Cette seconde étude a également permis de mettre en évidence un marqueur spécifique de la LGMD2A, le facteur de transcription FoxO1. Considérant la fonction de ces deux protéines, plusieurs solutions thérapeutiques innovantes ont pu être proposées. Des approches pharmacologiques peuvent être envisagées, ce qui permettrait de contourner les verrous technologiques de la thérapie génique. De façon très importante, les stratégies visant la protéine CARP offrent l'énorme avantage de pouvoir éventuellement traiter un nombre important de myopathies.

MATÉRIEL
et
METHODES

Fiche technique n°1 :

PLASMIDES, CLONAGES ET PRODUCTION D'AAV RECOMBINANTSPlasmides et clonages

Un certain nombre de constructions ont été réalisées en utilisant différentes méthodes pour obtenir l'insert: amplification par PCR ou restriction enzymatique. Après ligation des inserts avec les vecteurs linéarisés, les plasmides ont été produits par transformation et culture de bactéries chimiocompétentes *One Shot E. Coli TOP 10* (INVITROGEN) et purifiés à l'aide des *Plasmides Midi-Prep Kit* ou *Endofree Mega-Prep Kit* (QIAGEN).

Différents plasmides codant la protéine CARP, des fragments de CARP ou les protéines REPS1 et REPS2 ont été construits par clonage des ADNc correspondants dans le vecteur **pcDNA3.1D/V5-His-topo** (INVITROGEN). Les différents fragments d'ADN ont d'abord été amplifiés par PCR à partir d'ADNc murin synthétisé par reverse transcription d'ARNm issus de Psoas de souris 129SvTer ou d'ARN polyA de muscle squelettique fœtal ou adulte (dans le cas de REPS1 et REPS2), selon la méthode *Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (INVITROGEN). Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant des oligonucléotides sens contenant en 5' une séquence additionnelle (CACC) qui permet un clonage directionnel dans le vecteur pcDNA3.1 D/V5-His TOPO (amorces référencées dans le tableau ci-dessous). Les inserts ont ensuite été purifiés à partir d'un gel d'agarose 1% (w/v) selon le protocole du *QiaQuick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) avant d'être clonés dans le vecteur. La ligation a été réalisée par la mise en contact du vecteur et des ADNc.

L'ADNc de CARP a été cloné dans le vecteur **pSMD2** qui exprime une étiquette GST en position 5'. Pour cela, l'ADNc a été amplifié par PCR sur des ADNc spécifiques du muscle en utilisant des oligonucléotides (amorces référencées dans le tableau ci-dessous) contenant à leurs extrémités des sites de restriction enzymatiques ne coupant qu'une seule fois dans le polylinker du plasmide pSMD2. Ainsi, CARP possède les sites de restriction des enzymes NheI en 5' et de BglII en 3'. Plasmide et produit de PCR ont ensuite été digérés par ces enzymes (10 unités d'enzyme/μg de plasmide). La ligation entre le plasmide linéarisé et l'ADNc a été réalisée en présence de l'enzyme quick ligase T4 en suivant le protocole du fournisseur Quick ligation Kit (Biolabs).

Les plasmides pJerryCARP, pJerryDeltaNter et pJerryNter ont été réalisés par clonage de l'ADNc de CARP, DeltaNter ou Nter, à l'aide de la Quick T4 DNA ligase (BIOLABS), entre les sites de restriction XhoI et BamHI du plasmide **pJerry** (GENETHON). Ce plasmide contient les séquences codant pour les deux protéines fluorescentes eYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) et eCFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) de part et d'autre du multi-cloning site, ainsi qu'une étiquette His à la fin d'eCFP. Son utilisation permet l'observation directe, en fluorescence, de la protéine d'intérêt (ici CARP, DeltaNter et Nter).

De même, l'ADNc de la calpaïne 3 a été cloné entre les sites de restriction XhoI et HindIII du plasmide **pTOM** (structure identique à celle de pJerry sans l'étiquette His) selon la méthode précédemment décrite (Taveau *et al.*, 2003).

Les plasmides pcDNA3-GS-CAPN1 et pcDNA3-GS-CAPN2, codant pour les calpaïnes ubiquitaires « étiquetées V5 » ont été obtenus auprès de GeneStorm.

Le plasmide **pGG2-CARP-eYFP** a été construit dans le but de produire des particules AAV recombinantes exprimant CARP-eYFP (AAV-CARP-eYFP). La séquence de l'ADNc codant la protéine de fusion CARP-eYFP a été obtenue par restriction à partir du plasmide pJerryCARP (décrit précédemment) et insérée entre les séquences ITR de l'AAV2 présentes dans le plasmide pGG2 après digestion par Nhe1 et EcoRV.

Le plasmide **pGG2-mSEAP-shRNA-CARP** a été construit dans le but de produire des particules AAV recombinantes exprimant 2 *small hairpin RNA* (shRNA) dirigés contre CARP et la muSEAP (AAV-shRNA-CARP). Chacune des 2 séquences siRNA 13 (UUACCAGCUCCUCUACUCUTT) et siRNA 328 (UCAUAAUUUCAGGUUCUGGTT) a d'abord été transformée en shRNA et clonée en aval du promoteur H1. Pour cela, les séquences sens et anti-sens des ADN correspondants aux siRNA ont été introduites dans le plasmide pH1 de façon à être séparées par la séquence TTCAAGAGA pour former une tête d'épingle. Après digestion du plasmide pH1-shRNA13 par les enzymes PstI et KpnI, la séquence codant le shRNA13 a été clonée dans le plasmide pH1-shRNA328 linéarisé après digestion par l'enzyme KpnI. Le plasmide ainsi construit a été digéré par les enzymes PstI et KpnI et la séquences portant les 2 shRNA a été clonée dans le plasmide pXL3937 (pGG2 comportant la séquence de la muSEAP) après linéarisation par restriction enzymatique (PstI).

Toutes les constructions de plasmides ont été validées par séquençage, réalisé par le service de séquençage de GENETHON.

insert	plasmide	couple d'amorces de PCR
CARP	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'CACCATGATGGTACTGAGAG3'
		5'GAATGTAGCTATGCGAGAGTTC3'
deltaNter1	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'CACCATGGCCGAGTTCAGAAATGGAGAAG3'
		5'GAATGTAGCTATGCGAGAGTTC3'
deltaNter2	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'CACCATGCTGAAGACACTTCCGGCCAACAG3'
		5'GAATGTAGCTATGCGAGAGTTC3'
deltaNter3	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'CACCATGCTGAAAGCTGCGCTGGAGAAC3'
		5'GAATGTAGCTATGCGAGAGTTC3'
deltaNter4	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'CACCATGACCAAAGTTCCAGTTGTGAAGG3'
		5'GAATGTAGCTATGCGAGAGTTC3'
CARP Nter	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'GGAGAATATGAAGCTGCT3'
		5'AGCAGCTTCATATTCTCC3'
REPS1	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'CACCATGGAGCTTTGTGGTGCAACAAGACTTGG3'
		5'TAGGGGAAAAAATGGTCGAAGTTGTTCCAG3'
REPS2	pcDNA3.1D/V5-His-topo	5'CACCATGATGTCAAAGAATGATGGTGAG3'
		5'CAACACAGTGACCGGACGAAGTTG3'
CARP	pSMD2	5'CGCGCTAGCATGTCCCCTATACTAGGTTATTG3'
		5'GCGAGATCTTCAGTCACGATGCGGCCGCTCG3'

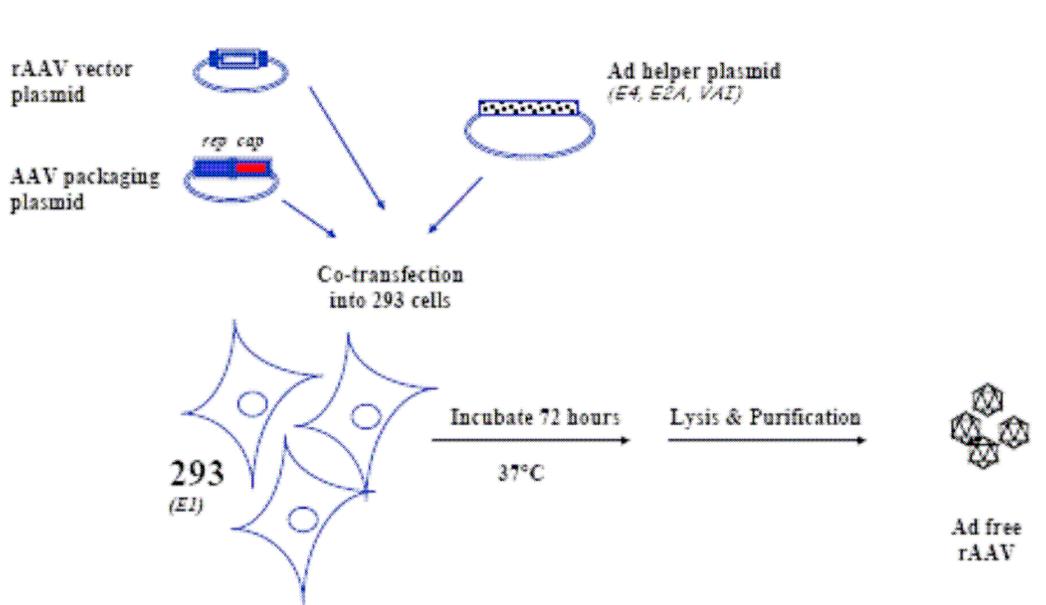
Production d'AAV recombinants (AAV-CARP-eYFP et AAV-shRNA-CARP)

Principe

Le virus Adéno-associé (AAV) est un parvovirus de petite taille, non-enveloppé et possédant une molécule d'ADN monocaténaire. Le génome code pour 4 protéines de réplication (*rep*) et 3 protéines de capsid (*cap*). Les séquences terminales répétées inverses (ITR) sont les deux seules séquences nécessaires en *cis* pour la réplication et l'assemblage des particules virales. Ce virus est incapable de se répliquer seul, sans la co-infection par un autre virus : adénovirus ou herpèsvirus.

Le vecteur recombinant dérivé de l'AAV, est composé uniquement de la capsid et du transgène. La capsid dépend du sérotype choisi (ici AAV1) et est responsable des propriétés antigéniques et du tropisme cellulaire. Le transgène (la séquence de l'ADNc de CARP par exemple) est bordé des séquences ITR de l'AAV2. Le virus recombinant ne contient aucun des gènes codant pour les protéines virales.

Pour préparer ce virus recombinant, notre stratégie a été de transfecter des cellules (T293) dans le but de leur faire produire les particules virales. 3 plasmides ont été nécessaires : le plasmide-vecteur qui apporte le gène d'intérêt, le plasmide helper (pRepCap) qui apporte les gènes viraux *Rep* et *Cap* et le plasmide pXX6 qui contient des gènes adénoviraux et qui remplace la co-infection par un adénovirus, nécessaire à la réplication de l'AAV. Les cellules sont ensuite lysées et les particules virales sont purifiées.



Méthode

- ❖ Ensemencement des cellules (jour 1)

Milieu : DMEM (4,5 g/L glucose + glutamax) + 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF)

On utilise des cellules 293 à confluence. Il en faut en quantité 5 flasques T 162 pour préparer une trentaine de boîtes de diamètre 15 cm et avoir un volume final de vecteur entre 2 et 3 mL.

- Aspirer le milieu
 - Rincer au PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ stérile (6 mL)
 - Trypsiner les cellules avec 2 mL de trypsine. Les 293 se décollent très rapidement, il ne faut pas les laisser longtemps dans la trypsine. Reprendre les cellules dans du milieu (8 mL), pooler les flasques et compter les cellules.
 - Ensemencer des boîtes rondes de 15 cm de diamètre, à raison de 6 à 10 millions de cellules par boîte. Compléter de milieu à 25 mL.
- ❖ Transfection des cellules (jour 3)

Solutions : - NaCl 150 mM
 - PEI (MM = 25) 10mM (solution-mère à 100 mM)

Milieu de transfection : DMEM (4,5 g/L glucose + glutamax) + 1% SVF + 1% Pénicilline-Streptomycine (PS)

Milieu post-transfection : DMEM (1 g/L glucose + glutamax) + 10% SVF + 1% PS

Les cellules doivent approcher une confluence de 70% avant d'être tri-transfectées avec :

- le plasmide-vecteur (12,5 µg / boîte 15 cm) (pGG2-CARP-eYFP ou pAAV-shRNA-CARP)
- pXX6, qui contient des séquences AdV (25 µg / boîte)
- pRepCap, qui varie selon le sérotype d'AAV, plasmide-helper (12,5 µg / boîte).

L'ADN est complexé avec du PEI : le PEI forme une vésicule type liposome autour de l'ADN, cette vésicule pénètre dans la cellule par endocytose.

- Préparer 2 tubes Falcons 50 mL par groupe de 5 boîtes 15 cm (30 boîtes : 6 Falcons « ADN » + 6 Falcons « PEI »).
- Dans les tubes « ADN », introduire les différents plasmides :

plasmide	quantité par boîte	quantité pour 5 boîtes	volume
pXX6	25 µg	125 µg	x µL
pRepCap	12,5 µg	62,5 µg	x µL
plasmide-vecteur	12,5 µg	62,5 µg	x µL

Compléter à 5 mL avec du NaCl 150 mM.

- La quantité de PEI 10mM en µL doit être 2,25 fois plus forte que le poids d'ADN total en µg. Dans les tubes « PEI », introduire 562,5 µL de PEI puis compléter à 5 mL avec du NaCl 150mM.
- Pour complexer l'ADN et le PEI, il faut toujours mettre le PEI dans l'ADN, et pas l'inverse. Mettre les 5 mL de PEI dans les 5 mL d'ADN, goutte-à-goutte et en respectant un intervalle de 1 min entre chaque mL. Ne pas agiter. Attendre 15-20 min.
- Mélanger dans un T162 le complexe et le milieu de transfection (12 mL par boîte, donc 360 mL pour 30 boîtes). Aspirer le milieu des cellules et le remplacer par 14 mL du mélange.
- Au bout de 6 h (5-7 h), ajouter dans les boîtes 12 mL de milieu post-transfection.

- ❖ Récolte des cellules (jour 6)

Solutions : A partir d'ici les solutions contiennent $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, car ces cations augmentent le nombre de particules infectieuses.

- Tampon de lyse : (PBS $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Hepes 50mM pH 7,6 (solution-mère 500mM pH 7,6), NaCl 150mM). Filtrer sur 0,45 μm .
- Sulfate d'ammonium saturé (ne jamais mélanger à la Javel)
- PBS with $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$
- Chlorure de Césium CsCl 1,35 g/mL
- Chlorure de Césium CsCl 1,5 g/mL

Réactifs : Benzonase (cette enzyme coupe tous les acides nucléiques en pentanucléides).

- Préparer un tube Falcon 50 mL pour 2 boîtes (30 boîtes : 15 Falcons).
- A l'aide d'un grattoir, gratter les cellules dans les boîtes (sans enlever le milieu) et distribuer dans les Falcons.
- Centrifuger 15 min à 1500 rpm. Reprendre les culots dans 1 mL de tampon de lyse (par falcon) puis pooler les tubes (10 mL pour 20 boîtes).
- Effectuer 4 cycles de congélation (carboglace + éthanol) / décongélation (37°C). Vortexer avant chaque recongélation (4^{ème} congélation à -80°C).
- Centrifuger le Falcon à 2500 rpm pendant 15 min.
- Transférer le surnageant dans 1 tube Beckmann à bouchons. Ajouter 5 μL de Benzonase. Incuber 15 min à 37°C.
- Centrifuger à 8500 rpm 20 min à + 4°C.
- Précipitation au sulfate d'ammonium : ajouter un volume de sulfate d'ammonium saturé, laisser le tube dans la glace pendant 1 h.
- Centrifuger à 10000 rpm 30 min à +4°C. Jeter le surnageant (poubelle déchets biologiques : pas de contact sulfate d'ammonium - javel).
- Resuspendre à la pipette les culots dans 2 mL de PBS 1X.
- Préparer 2 tubes à gradient (Beckmann 9 mL). Dans chaque tube, introduire :
 - 3 mL de CsCl 1,35 g/mL
 - 3 mL (mesurés au Falcon) de CsCl 1,5 g/mL sous la 1^{ère} couche, sans bulle, à la pipette Pasteur
 - le virus (dissous en PBS : environ 2 mL) sur la paroi du haut, doucement à la pipette Pasteur.
 - Rincer les Falcons au PBS, et compléter les tubes à gradients avec le produit de rinçage, de façon à ce que la base du ménisque soit au-niveau du trait.
- Fermer les tubes avec les petits bouchons noirs, puis avec les bouchons marron.
- Mettre les tubes dans le rotor 90 TI, puis dans l'ultracentrifugeuse (OVN à 67000 rpm).

❖ Collecte des fractions (jour 7)

- Arrêter l'ultracentrifugeuse, enlever le rotor. Sous hotte, récupérer les 2 tubes à la pince. On peut voir une bande blanche qui correspond aux protéines. Plus cette bande est fine et plus la préparation est propre.
- Nettoyer le récolteur de fractions et le monter. Régler le trou de l'aiguille à 2-3 mm au-dessus de la grosse vis. Mettre 3 bâtonnets en métal dans les trous « D ».

- Préparer un bécher avec de la javel, y jeter les bouchons noirs. Préparer deux fois 10-12 tubes 1,5 mL numérotés.
- Placer le tube ouvert entre les bâtonnets. Percer le tube et récolter par fractions :
 - d'environ 45 gouttes (1 mL) pour le 1^{er} gradient
 - d'environ 25 gouttes (500µL) pour le 2^{ème} gradient

Arrêter la récolte juste avant les protéines. Jeter les tubes dans la Javel.

- Prélever 10 µl de chaque fraction et les sortir pour le flash dot
- Garder le reste des fractions à +4°C

❖ Flash dot

- Ajouter 390 µl de tampon NaOH/EDTA à chaque aliquote
- Dénaturer: 10 min à 95°C, puis dans la glace après un court spin.
- Préparer l'appareil à dot-blot :

Brancher l'arrivée d'air sur la pompe à vide. Mettre le joint, ainsi qu'un papier Wattman et une membrane (11,5 x 8 cm) préalablement trempés dans l'eau. Fermer l'appareil, serrer les vis.

Dans tous les puits, déposer 400 µL d'eau. Faire le vide et revisser l'appareil. Quand l'eau est passée, arrêter le vide.

Faire passer les échantillons, faire le vide puis l'arrêter

Faire passer 400 µL par puits de NaOH/EDTA pour rincer (vide).

Desserrer les vis, écrire un numéro sur la membrane pour la repérer (en haut à gauche) et la faire tremper en SSC 2X.

Enrouler la membrane et la placer dans un tube à hybrider ADN vers l'intérieur

Ajouter 8ml de tampon d'hybridation préchauffé à 55°C

Incuber dans le four à hybrider 15 min

Ajouter la sonde dans le tube et incuber toute la nuit dans le four à 55°C

❖ Lavages et résultats

Solutions :

- Tampon lavage 1 (à préparer la veille au plus tôt)
- Tampon lavage 2 (préparer à 20X et extemporanément : 1X + MgCl₂)

- Préchauffer le tampon de lavage 1 à 55°C.
- Jeter le tampon d'hybridation.
- Ajouter 100 mL de tampon de lavage 1, laisser 10 min dans le four à 55°C.
- Répéter l'opération.
- Laver 2 x 5 min à température ambiante avec 2 x 200 mL de tampon de lavage 2 (sous légère agitation)
- Egoutter la membrane sur un couvercle plastique (ne pas la sécher).
- Au fond d'un bac, déposer 2-3 mL de substrat. Poser la membrane : DNA sur le substrat, sans bulles. Laisser en contact 1 min.
- Déposer la membrane dans une fiche plastique, sans bulles. Entourer le montage de papier aluminium (attention à ne pas appuyer sur la membrane, ça peut étaler le signal).
- On peut faire une première révélation au STORM au bout de 5 min. Si le signal est trop faible, attendre encore un peu.

❖ Purification des fractions positives

Pooler les fractions positives et refaire un gradient au CsCl. Déposer les fractions mélangées au fond d'un tube Beckmann, remplir ensuite avec du CsCl 1,41 g /ml jusqu'au bord.

Ultracentrifugation identique à la première sur la nuit

On récolte les fractions le lendemain selon le même protocole mais par environ 25 gouttes cette fois.

On refait un flash dot pour déterminer quelles sont les fractions qui contiennent le virus.

❖ Dialyse (jour 7-8)

Solutions : PBS Ca²⁺/Mg²⁺

Cette étape vise à éliminer le chlorure de césium dans la prep.

- Pooler les fractions positives dans un tube Eppendorf (selon le volume)
- Dans un bécher de 2L, introduire environ 1L de PBS 1X filtré et un barreau aimanté (PBS 10X dilué dans de l'eau autoclavée).
- Dans une cassette de dialyse, introduire à la seringue 2 mL (aiguille fine 8G) les fractions conservées ; aspirer l'air restant dans la cassette.
- Mettre la cassette sur un flotteur et laisser dans le PBS au moins 1 heure sous agitation douce en chambre froide.
- Faire 5 lavages identiques (5 béchers de 1L)

❖ Aliquotage (jour 8)

- Sortir la cassette de dialyse du PBS, l'éponger sur papier absorbant.
- Préparer une vingtaine de tubes 1,5 mL.
- Aspirer à la seringue le contenu de la cassette, le mettre dans 1 tube Eppendorf, mélanger rapidement.
- Aliquoter dans les tubes Eppendorf par volume adéquate aux manip désirées
- Aliquoter séparément une dizaine de μ L pour la titration

❖ Dosage du vecteur en particules physiques et en particules infectieuses par dot blot

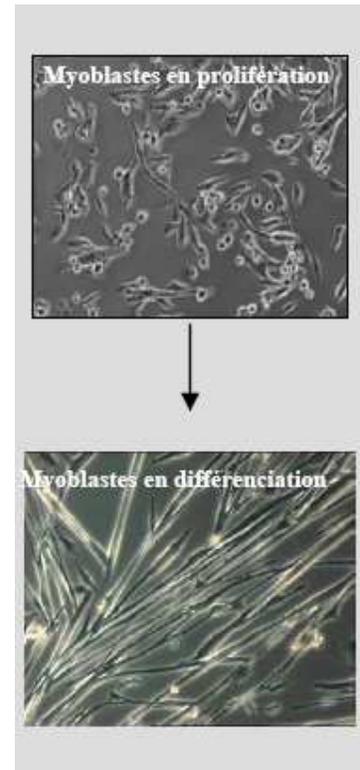
Fiche technique n°2 :

CULTURE CELLULAIRE ET TRANSFECTIONS**Culture cellulaire**

La lignée cellulaire NIH3T3 a été obtenue auprès de l'*American Type Culture Collection* (Rockville, Md.) et cultivée dans un milieu contenant du *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)* (CAMBREX) additionné de gentamicine (10µg/mL) (Gibco INVITROGEN) et de 10 % (v/v) de SVF (HyClone).

Les myoblastes murins C2 ont été obtenus auprès de Yaffe D. et Saxel O. (Yaffe and Saxel, 1977) et cultivés dans un milieu contenant du DMEM additionné de 10µg/mL de gentamicine et de 20 % (v/v) de SVF. Les myotubes ont été obtenus par remplacement du milieu de culture des myoblastes par un milieu de différenciation contenant du DMEM, de la gentamicine et 5 % (v/v) de sérum de cheval (*Horse Serum Donor Herd*, Gibco INVITROGEN). Les cellules musculaires différenciées ont été maintenues dans ce milieu entre 4 et 10 jours après la mise en différenciation.

Les différentes cultures ont été incubées à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

**Transfections****Principe :**

On appelle transfection le processus de transfert de gènes, c'est-à-dire l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes. Elle est typiquement réalisée par l'ouverture transitoire de "trous" dans les cellules pour permettre l'entrée de molécules extracellulaires, comme un plasmide d'ADN superenroulé, un siRNA, etc...

Méthodes :

- ❖ Pour les cellules NIH3T3, les transfections de plasmides ont été réalisées à l'aide du *FUGENE 6 transfection reagent* (Roche Applied Science) 24 h après ensemencement des cellules, soit à une confluence de 50 % environ, selon le protocole suivant :
 - Déposer 200µL de DMEM sans SVF dans un tube polystyrène (T1)
 - Ajouter 6 µL de FUGENE et mélanger doucement. Laisser incuber 10 min.

- Dans un second tube (T2) déposer 1µL de plasmide à 1µg/µL soit 1µg/puits
 - Reprendre les 200µl de FUGENE + DMEM et les déposer goutte à goutte dans le T2
 - Mélanger doucement et incuber 30 à 45 min sans aucune agitation
 - Changer le milieu des cellules par 1 mL de milieu complet propre
 - Déposer le contenu d'un tube par puits
 - Mélanger doucement et placer la boîte dans l'incubateur au moins 24h à 48h
- ❖ Pour les cellules C2, plus difficiles à transfecter, la même méthode que précédemment a été appliquée deux fois à 24 heures d'intervalle. La première transfection a été effectuée lorsque les cellules présentaient une faible confluence (20-30 %) et la deuxième a été réalisée juste avant la mise en différenciation lorsque les cellules étaient à une confluence plus élevée (80 %).

Remarque : Lors de la recherche des facteurs de transcription dérégulés en présence de CARP, par la technique de *TranSignal DNA/Protein array*, les cellules transfectées ont été sélectionnées en utilisant le kit « Transfected Cell Selection » (Miltenyi Biotec). Pour cela, les C2 ont été co-transfectées par le plasmide pcDNA3.1-CARP et par le plasmide pMACSKKII qui code une protéine membranaire (tronquée). Il a ensuite été possible de trier les cellules transfectées grâce à des billes couplées avec un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine. Il faut préciser que le témoin reçoit KKII seul.

- ❖ Lors des transfections de siRNA, les meilleurs résultats ont été obtenus avec la lipofectamine (GIBCO) et le milieu optiMEM en suivant le protocole décrit :
- Dans un tube T1, mettre 1 µg de chaque plasmide, 0,2 µg de siRNA et 100 µL d'optiMEM
 - Dans un tube T2, mettre 20 µL de lipofectamine et 100 µL d'optiMEM, laisser agir 5 min à RT
 - Mélanger le contenu des 2 tubes et laisser les lipoplexes se former pendant 20-25 min à RT
 - Diluer le contenu du tube dans 1 ml de milieu optiMEM
 - Rincer les cellules avec du milieu optiMEM sans sérum et sans antibiotique
 - Répartir le contenu du tube sur l'ensemble des cellules rincées
 - Placer la boîte dans l'incubateur 24 à 72 h à 37°C

Fiche technique n°3 :

EXTRACTION DES PROTEINES ET ANALYSES

Extraction des protéines à partir de lysat cellulaire ou de tissu musculaire

❖ Extraction des protéines totales

24 heures après transfection (pour les fibroblastes NIH3T3 et myoblastes C2) ou 4 à 10 jours après la mise en différenciation (pour les myotubes C2), les cellules ont été lavées avec du *phosphate-buffered saline* (PBS ; Gibco INVITROGEN) et les protéines extraites dans un tampon contenant 50 mM d'HEPES, 0.1 mM d'EDTA, 0.1 % (v/v) de CHAPS (pH 7,4), 150 mM de NaCl et des inhibiteurs de protéases (*complete mini protease inhibitor cocktail* ; Roche Biomedicals). Les protéines solubles sont retrouvées dans le surnageant, après élimination des éléments insolubles par centrifugation à 12000g, pendant 10 min à 4°C.

Les muscles, prélevés sur souris vivantes et anesthésiées, ont été immédiatement broyés à l'aide d'un homogénéiseur *ultra-turrax T8* (IKA-WERKE) dans un tampon contenant 20 mM de Tris (pH 7,5), 2 mM d'EGTA, 1 % (v/v) de TRITON X-100, 150 mM de NaCl et des inhibiteurs de protéases.

La concentration en protéines des extraits obtenus (issus de cellules ou de tissus entiers) a été déterminée par la méthode *BCA* (PIERCE).

❖ Extraction des protéines par fractionnement subcellulaire

Dans le cas de certaines de nos expériences, les cellules ont été resuspendues dans leur milieu de culture puis centrifugées à 500 g pendant 10 min à 4°C. L'extraction des protéines a ensuite été réalisée à partir du culot cellulaire à l'aide du kit « Subcellular Proteome Extraction » (CALBIOCHEM) dans le but de réaliser un sous-fractionnement permettant d'obtenir les protéines en différentes fractions : la fraction cytosolique, la fraction nucléaire, les protéines du cytosquelette et les protéines des membranes et organelles.

❖ Extraction des protéines nucléaires

Lors de l'étude de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription, les cellules ont été resuspendues dans leur milieu de culture puis centrifugées à 500 g pendant 10 min à 4°C. Les protéines nucléaires ont ensuite été isolées à l'aide du kit « Nuclear Extract » (ACTIVE MOTIF) selon les instructions du fournisseur.

Analyse protéomique par la technique du Western-Blot

Principe :

Un western blot (ou immunoblot) est une méthode de protéomique, ayant recours à la biologie moléculaire, la biochimie et l'immunogénétique, pour détecter une protéine spécifique dans un échantillon donné d'extrait ou d'homogénéisat tissulaire. La technique utilise l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur masse. Les protéines sont ensuite transférées depuis le gel sur une membrane, où elles sont exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt. Il est possible grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu, d'évaluer sa taille, sa concentration, les variations de cette concentration, effectuer des comparaisons de concentrations entre différents groupes, etc.

Méthode :

Après extraction, les protéines ont été dénaturées par addition de 10µL de tampon dénaturant (*Nupage LDS Sample Buffer* (Invitrogen)) additionné de DTT (100mM) et chauffage à 70°C pendant 10 minutes. Les échantillons protéiques ont ensuite été déposés sur gels de sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide précoulés (4-12 % Bis-Tris) (INVITROGEN) et soumis à une électrophorèse à l'aide du système NuPage (INVITROGEN), pendant 1h à 150 V. Les protéines, une fois séparées, ont été électro-transférées sur membrane *Immobilon-P PVDF* (Millipore) par le système BIORAD, pendant 1 h à 100 V. Afin d'évaluer l'efficacité de ce transfert, les protéines présentes sur les membranes ont ensuite été colorées au Rouge Ponceau 0.2 % (w/v). Après saturation dans du lait 3%-TTBS (Sigma)-BSA 0.5 % (w/v)(Sigma) pendant 1 h, les membranes ont été hybridées avec les anticorps primaires dirigés contre l'épitope V5 (dilution 1:5000 dans du TTBS-lait 1% (w/v)), contre CARP (dilution 1:500), contre la calpaïne 3 (dilution 1:150), contre HSP-27 (dilution 1:100), contre γ -Sarcoglycan (dilution 1:100), contre l'histone H1 (dilution 1:500), contre la vimentine (dilution 1:200), contre la GFP (dilution 1:500), contre la GST (dilution 1:15000), ou contre RhoGDI (dilution 1:500) pendant 1h à température ambiante. Après lavages dans du TTBS (4x5 min), les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires *sheep anti-mouse ou donkey anti-rabbit couplés à la HorseRadish Peroxidase* (HRP)(dilution 1:10000) pendant 45 min à température ambiante (sauf dans le cas de l'hybridation avec l'anticorps primaire anti-GST déjà couplé à l'HRP). Après lavages dans du TTBS (4x5 min), la révélation a été réalisée avec le kit « SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate » (PIERCE).

Lors de ces analyses, les poids moléculaires des protéines ont été estimés par comparaison avec le marqueur *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD).

Les membranes PVDF ont pu être deshybridées par incubation dans un tampon contenant du Tris (pH 6,8 ; 65 mM), 2 % de SDS (w/v) et du DTT (100 mM) pendant 30 min à 50 °C. Les membranes ont ensuite été lavées (6x5 min) dans un grand volume de TTBS, avant d'être ré-hybridées avec d'autres anticorps.

Analyse protéomique par électrophorèse en deux dimensions

Principe :

L'électrophorèse bidimensionnelle permet, comme précédemment, de séparer les protéines, mais cette fois en fonction de deux paramètres : leur point isoélectrique et leur masse.

Méthode :

Après précipitation des protéines à l'acétone, les extraits protéiques (200 µg), réhydratés dans un tampon contenant de l'urée (8M), 2 % de CHAPS (v/v), 0,002 % de Bleu Bromophénol (v/v), 0,5 % d'ampholytes (v/v) et du DTT (20 mM), ont été soumis à une électrophorèse en 2 dimensions. La première étape a été de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique par électrophorèse à l'aide du système *Zoom IPGRunner* (INVITROGEN) (30 min 300 V, 4h30 min 500 V, 2h 50 V). Ensuite, les protéines ont été soumises à une électrophorèse classique (décrite dans le paragraphe « Analyses par la technique du Western-Blot ») afin de les séparer en fonction de leur poids moléculaire.

Analyse par immunoprécipitation

Principe :

Le principe de l'immunoprécipitation, utilisé pour déceler des interactions entre deux protéines ou pour purifier un composé dans une solution, repose sur la capacité des protéines à former des complexes avec les anticorps qui leur sont spécifiques, permettant ainsi l'agglutination et la précipitation de la cible avec les anticorps. Cette technique a été utilisée pour valider les partenaires de CARP identifiés lors du criblage par double-hybride.

Méthode :

Les lysats cellulaires (500 µL) contenant la protéine CARP-V5 (ou REPS1-V5 ou REPS2-V5) ont été incubés avec 2 µg d'anticorps dirigé contre l'épitope V5 pendant 2 heures à 4°C sous agitation rotatoire. La précipitation du complexe protéines-anticorps a été réalisée par addition de 30 µL de protéine G-sépharose suspendue dans du tampon de lyse (*protein G Sepharose 4 Fast Flow*, Amersham Biosciences) pendant 45 minutes à 4°C sous agitation. Les billes de sépharose sur lesquelles le complexe protéique était fixé ont ensuite été séparées du surnageant par une centrifugation de 1 minute à 1.000 g, puis lavées 4 fois avec 1 mL de tampon de lyse (des centrifugations de 1 minute à 1.000 g permettent de précipiter les billes entre 2 lavages). Après dénaturation des protéines présentes dans le surnageant et sur les billes, les extraits obtenus ont été analysés par western-blot.

Purification par chromatographie d'affinité

Principe

La chromatographie d'affinité est réalisée avec une résine sur laquelle est fixée une molécule ayant la propriété de lier spécifiquement celle qu'on veut isoler. Cette molécule est appelée ligand. Par exemple si on attache un anticorps, en guise de ligand, sur une résine, celle-ci acquerra une affinité pour l'antigène correspondant. Les molécules ayant une affinité particulière pour le ligand sont ensuite récupérées après adsorption, élution des molécules n'ayant pas d'affinité pour le ligand et désorption. Cette technique a été utilisée pour valider les partenaires de CARP identifiés lors du criblage par double-hybride.

Méthode

La purification par chromatographie d'affinité des protéines contenant l'étiquette Glutathione-S-Transférase (GST) a été réalisée sur les protéines solubles. Pour cela, les protéines ont été mises en contact avec 30 μ L de billes *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow* (Amersham Biosciences) suspendues dans du tampon de lyse (1/1) pendant 2 heures à 4°C sous agitation rotatoire. Une centrifugation de 1 minute à 1.000 g a permis de séparer le surnageant des billes sur lesquelles la protéine d'intérêt et ses partenaires étaient fixés. Les billes ont été lavées 4 fois avec 1 mL de tampon de lyse (des centrifugations de 1 minute à 1000 g ont permis de précipiter les billes entre 2 lavages). Après dénaturation des protéines présentes dans le surnageant et sur les billes, les extraits obtenus ont été analysés par western-blot.

Anticorps utilisés

L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope V5 (INVITROGEN) a été utilisé pour la détection de CARP et des différents fragments DeltaNter, pour la détection des calpaïnes ubiquitaires 1 et 2, pour la détection de REPS1 et de REPS2 ainsi que pour l'immunoprécipitation de CARP, REPS1 et REPS2. La purification de CARP par chromatographie d'affinité a été réalisée grâce à un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la GST (Sigma). La détection de RhoGDI lors de l'immunoprécipitation de CARP a été réalisée grâce à l'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre RhoGDI2 (*Upstate*).

La calpaïne 3 a été détectée en utilisant un anticorps polyclonal de lapin (B3) dirigé contre l'épitope QESEEQQFRNIFKQ présent dans l'exon 17 (Baghdigian 1999). L'anticorps polyclonal spécifique de CARP a été obtenu après injection à des lapins du peptide KTLPANSVKQGEEQRK. Les deux anticorps cités précédemment ont été gracieusement fournis par le docteur Ahmed Ouali. La protéine eYFP a été détectée grâce à un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la GFP (Abcam).

L'efficacité du fractionnement subcellulaire a été vérifiée en utilisant les anticorps anti-HSP 27 de chèvre (Santa Cruz), anti-Histone H1 de souris (Santa Cruz), anti-Vimentine de chèvre (Sigma) et anti-gamma Sarcoglycane de souris (Novo Castra).

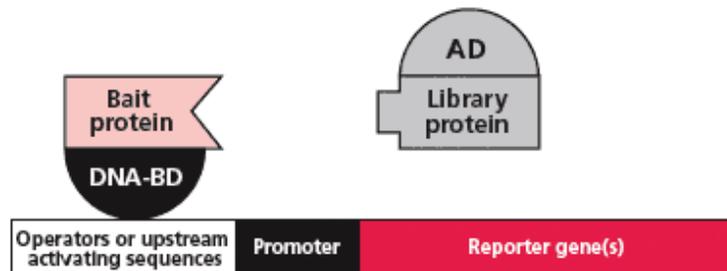
Différents anticorps secondaires ont été utilisés : un anti-IgG de lapin, produit chez le singe, un anti-IgG de souris, produit chez le mouton, et un anti-IgG de chèvre, produit chez le lapin, couplés à la peroxydase (Amersham Biosciences).

Fiche technique n°4 : SYSTEME DE DOUBLE HYBRIDE CHEZ LA LEVURE

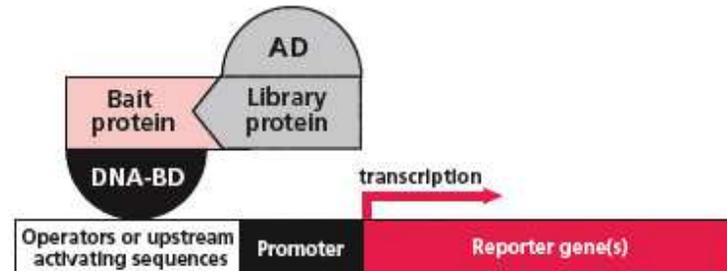
Principe

Le système de double hybride est basé sur le fait que, chez les eucaryotes, les activateurs transcriptionnels comprennent le plus souvent deux domaines distincts : un domaine de liaison à l'ADN (DNA-BD pour DNA Binding Domain) et un domaine d'activation de la transcription (AD pour Activation Domain). Le DNA-BD se lie à une séquence spécifique du promoteur et l'AD invite le complexe RNA-polymérase II à transcrire le gène situé en aval. Les deux domaines agissent comme des modules indépendants : seul, aucun d'entre eux ne peut activer la transcription, mais chacun des domaines reste fonctionnel lorsqu'il est fusionné à d'autres protéines. Dans le système de double hybride, l'ADNc de la protéine d'intérêt est cloné dans un plasmide de manière à exprimer une protéine fusionnée au DNA-BD. L'ADNc d'une autre protéine (ou une banque d'ADNc) est cloné dans un plasmide de façon à exprimer une protéine fusionnée au AD. Si les deux protéines interagissent, les domaines DNA-BD et AD se retrouvent à proximité l'un de l'autre. Le complexe devient fonctionnel et la transcription du gène rapporteur est activée.

Noninteracting proteins



Interacting proteins activate transcription of reporter



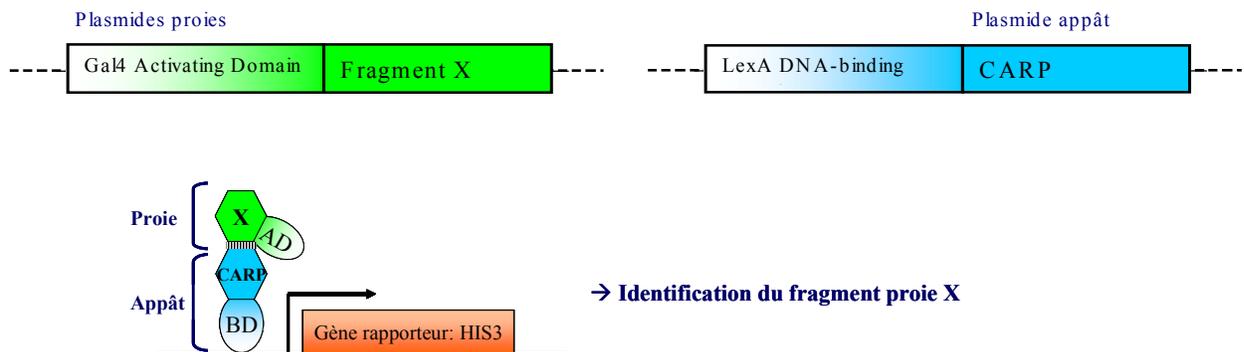
Méthodes

Double hybride classique

La technique de double-hybride classique a été utilisée pour tester l'hypothèse d'une interaction entre CARP et la calpaïne 3, ainsi que pour valider l'interaction entre CARP (clivé ou non) et la bande N2A de la titine. Ces expériences ont été effectuées à l'aide du kit « *BD Matchmaker Two-hybrid System* » (*BD Biosciences, Clontech*) selon les instructions du fournisseur. Les différents ADNc d'intérêt ont été fusionnés soit au domaine DNA-BD de GAL4 dans le plasmide pAS, soit au domaine AD de lexA dans le plasmide pGAD. Des levures compétentes ont été transformées par les couples de plasmides codant les protéines dont l'interaction était testée. Seules les levures exprimant deux protéines capables d'interagir ont pu survivre dans un milieu dépourvu d'histidine grâce à la transcription du gène rapporteur HIS3.

Criblage par la technique de double hybride à haut débit

La technique de double-hybride a été utilisée pour réaliser un criblage à haut débit des partenaires de CARP dans le muscle squelettique. Cette expérience a été effectuée en collaboration avec le prestataire de service *Hybrigenics* (projet décrit dans la partie Résultats). L'ADNc de CARP - l'appât - a été cloné en fusion avec la séquence du domaine de liaison à l'ADN de lexA (*lexA_BD*) dans le vecteur pB27. Une librairie d'ADNc polyA issue de muscle squelettique fœtal et adulte a été clonée dans le vecteur pP6, plasmide qui code également le domaine d'activation de Gal4 (*Gal4-AD*). Cette librairie de proies (contenant 10 millions de clones) et l'appât ont été utilisés pour transformer des levures compatibles placées sur un milieu sélectif. S'il y a interaction directe entre les deux protéines (appât et proie), la transcription du gène rapporteur HIS3 est activée et les levures deviennent capables de proliférer sur le milieu (qui ne contient pas d'histidine). Les plasmides pP6 des levures ayant résisté à la sélection ont été séquencés en 5' et 3' et une comparaison de séquences a été réalisée entre ces séquences et différentes banques D'ADNc sur GenBank. Pour chaque protéine identifiée, un PBS (Predicted Biological Score) a été défini. Celui ci varie entre A et E et reflète la probabilité d'interaction *in vivo*. Un SID (Selected Interacting Domain), ou domaine d'interaction minimal, a aussi été déterminé. Il s'agit de la partie minimale commune entre chaque clone proie interagissant avec un même appât.



Fiche technique n°5 :

IMMUNOMARQUAGES ET IMAGERIE**Immunomarquages****Immunocytochimie : marquage de CARP-V5 sur cellules**

24 h après transfection, les cellules ont été fixées à la formaline 3.7 % (Sigma) pendant 20 min et perméabilisées avec du PBS contenant 0.2 % (v/v) de TRITON X-100 (Sigma) pendant 30 min. Puis les sites non-spécifiques ont été saturés par du PBS-SVF 20 % (v/v) pendant 1 h. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire dirigé contre l'épitope V5 (INVOTROGEN) (dilution 1:200 dans du PBS-SVF 2 %) pendant 2 h puis avec l'anticorps secondaire Goat-anti-mouse Alexa Fluor 633 (Molecular Probes) (dilution 1:1000) pendant 1 h, après lavages (3x5 min) au PBS. Les montages entre lames et lamelles ont été réalisés à l'aide de *Vectashield* contenant du DAPI (4'-6'-DiAmidino-2-PhénylIndole) (VECTOR Laboratories). Les lames ont été observées par microscopie à fluorescence à l'aide d'un microscope confocal (*DMRE* Leica).

Immunohistochimie**❖ marquage des myosines lentes sur coupes musculaires**

Les coupes musculaires transversales (8 à 10 µm d'épaisseur) ont été obtenues par cryosections réalisées par le service d'histologie de GENETHON et étalées sur lames. Après décongélation des coupes musculaires, les myosines lentes ont été immunomarquées à l'aide du kit *ARK peroxidase* (DAKO). Après réhydratation des coupes pendant 5 min dans du PBS, la peroxydase endogène a été bloquée par la solution *Peroxidase Block* du kit pendant 15 min à température ambiante (en chambre humide). Les coupes ont ensuite été rincées pendant 5 min dans du PBS avant d'être incubées pendant 30 min à température ambiante (en chambre humide) avec l'anticorps primaire anti-myosines lentes (*anti-skeletal Myosin Slow* SIGMA) dilué au 1 :1000 dans une solution de PBS contenant le *Biotinylation Reagent* et le *Blocking Reagent*. Après lavages au PBS (3x10 min), les coupes ont été incubées avec la *Streptavidin-Peroxidase* pendant 15 min à température ambiante puis lavées au PBS (3x10 min). Enfin, les coupes ont été recouvertes du mélange DAB (*Buffered Substrate + Liquid diamino-3,3'benzidine (DAB) + Chromogen*) et incubées pendant 5 min à température ambiante. Après un lavage à l'eau (10 min en renouvellement constant), les lames ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min) avant d'être montées avec le milieu *Eukitt* (Fluka).

Les coupes ont été observées au microscope (Nikon eclipse E600) et les images, à partir desquelles le nombre de fibres lentes (positives pour le marquage) a été compté, ont été capturées par une caméra CCD (Sony). Les résultats présentés correspondent à des moyennes (+/- SEM). Leur significativité a été évaluée à l'aide du test *Mann Whitney*.

❖ Marquage des laminines sur coupes musculaires

L'immunomarquage histochimique des laminines a été utilisé pour mettre en évidence le contour des fibres musculaires sur les coupes transversales de muscle afin de pouvoir compter le nombre de fibres et mesurer leur diamètre.

Les coupes musculaires transversales ont été obtenues comme décrit précédemment et traitées à l'eau oxygénée pendant 20 min à température ambiante (en chambre humide) pour inhiber la peroxydase endogène avant d'être rincées dans du PBS pendant 5 min. Après saturation des sites non-spécifiques par du PBS-sérum de chèvre 10% (v/v) pendant 30 min, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire (anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la laminine, dilué au 1 :1000, DAKO) pendant 1 nuit à 4°C en chambre humide. Après lavages au PBS (3x10 min), les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire du kit *En Vision™ Rabbit HRP* (anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, produit chez la chèvre, DAKO) pendant 30 min à température ambiante. Après lavages au PBS (3x10 min) et traitement au DAB (voir ci-dessus), les lames ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min) avant d'être montées avec le milieu *Eukitt* (Fluka).

Les coupes ont été observées au microscope (Nikon eclipse E600) et les images ont été capturées par une caméra CCD (Sony) avant d'être traitées par le logiciel Ellix (Microvision, Evry) pour estimer le nombre et la taille des fibres. Les résultats présentés correspondent à des moyennes (+/- SEM). Leur significativité a été évaluée à l'aide du test *Kolmogorov Smirnov*.

❖ Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran

L'Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) est une coloration simple utilisée en routine histopathologique qui permet de mettre en évidence spécifiquement les différentes structures tissulaires et cellulaires. L'hématéine (colorant basique) colore les acides nucléiques en bleu noir tandis que la phloxine (colorant acide) colore en rouge plus ou moins intense les cytoplasmes et certaines structures extracellulaires, qui sont dits « éosinophiles ». Enfin, le safran colore les fibres de collagène en jaune-orangé.

Les coupes transversales ont été obtenues comme décrit précédemment et colorées à l'hématoxyline de Harris (Sigma) pendant 3 min. Après lavage à l'eau, les lames ont été plongées (passage) dans une solution d'alcool chlorhydrique à 0.2% (v/v) afin d'éliminer l'excédent de colorant. Après un nouveau lavage à l'eau, les tissus ont été bleuis dans l'eau de Scott (solution à 3,5 g/l de bicarbonate de sodium et 20 g/l de sulfate de magnésium) pendant 1 min avant d'être de nouveau rincés à l'eau et colorés à la phloxine 1% (m/v) (Sigma) pendant 30 s. Après rinçage à l'eau, les coupes ont été déshydratées à l'éthanol 70° pendant 1 min (au maximum), puis rincées dans l'éthanol absolu. Les tissus ont ensuite été colorés au safran 1% (v/v dans de l'éthanol absolu) pendant 3 min et rincés à l'éthanol absolu. Pour finir, les coupes ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min). Puis les lames ont été montées en milieu *Eukitt* et observées à l'aide d'un microscope (Nikon eclipse E600).

❖ Coloration de la muSEAP sur coupes musculaires

Une révélation histo-enzymatique de la murine Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (muSEAP) a été réalisée sur les coupes de muscles ayant préalablement reçu le vecteur AAV-shRNA-CARP afin d'évaluer l'efficacité de transfert du vecteur.

Après décongélation, les coupes transversales (obtenues comme décrit précédemment) ont été fixées pendant 10 min dans une solution de glutaraldéhyde 0,5 % (v/v) avant d'être rincées deux fois dans du PBS à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées dans du PBS (sans calcium, ni magnésium) pendant 30 min à 65°C afin d'inhiber l'activité de la phosphatase alcaline endogène, puis rincées dans du PBS pendant 10 min à température ambiante. La coloration « violette » de la muSEAP a été mise en évidence en incubant les coupes (pendant au moins 5 heures dans une chambre humide à 37°C) dans une solution contenant 0,1 M de

Tris-HCl (pH = 9,5), 0,1 M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, 0,0165 % (m/v) de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Promega) et 0,033 % (m/v) de nitrobleu tetrazolium (NBT) (Promega). Les coupes ont ensuite été rincées dans du PBS (sous agitation) avant d'être contre-colorées pendant 1 min dans une solution appelée « rouge à noyaux » contenant 1 mM de 1,2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo(2,1-b)thiozole (levamisole) (Sigma), puis rapidement rincées à l'eau froide et plongées pendant 4 min dans du butanol. Pour finir, les coupes ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min). Puis les lames ont été montées en milieu *Eukitt* et observées à l'aide d'un microscope (Nikon eclipse E600).

❖ Marquage des noyaux apoptotiques sur coupes musculaires

L'effet de la surexpression de CARP sur le nombre de noyaux apoptotiques dans les fibres musculaires a été visualisé grâce la technique Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling (TUNEL).

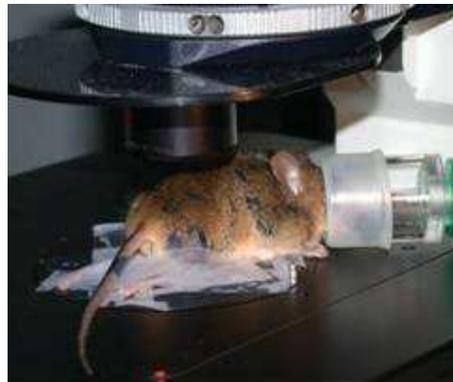
Après décongélation, les coupes transversales (obtenues comme décrit précédemment) ont été fixées dans une solution de formaline 3.7 % (Sigma) pendant 20 min avant d'être rincées dans du PBS à température ambiante. La fragmentation de l'ADN a été visualisée à l'aide du kit "In Situ Cell Death Detection" (Boehringer Mannheim) selon les instructions du fournisseur. Les montages entre lames et lamelles ont été réalisés à l'aide de *Vectashield* contenant du DAPI (4'-6'-Diamidino-2-PhénylIndole) (VECTOR Laboratories). Les témoins positifs ont été obtenus en traitant certaines coupes avec 0,5 mg/ml de DNAase1 (Sigma) pendant 10 min à température ambiante avant de réaliser le marquage TUNEL. Les témoins négatifs ont été obtenus de la même façon en supprimant l'addition terminale de TdT. L'analyse par microscopie à fluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal (*DMRE* Leica).

Imagerie

Analyses en microscopie confocale

Les photographies de cellules ou de tissus musculaires fixés ont été réalisées grâce à l'utilisation d'un microscope confocal à fluorescence (*DMRE* Leica) ou d'un microscope (Nikon eclipse E600) couplé à une caméra CCD (Sony).

Pour les observations de fluorescence *in vivo*, 7 jours après l'injection des plasmides, les souris ont été anesthésiées en intra-péritonéal (Kétamine 100 mg/kg et Xylazine 1 mg/kg) ou par voie respiratoire (isoflurane 2,5%), la peau entourant les TA a été excisée et une lamelle de verre a été positionnée directement sur les muscles à observer. L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal (*DM-IRBE* Leica).

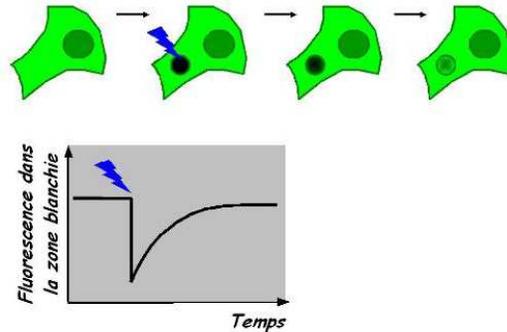


Expériences de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP)

Principe :

La redistribution de fluorescence après photoblanchiment (pour *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, FRAP) est une méthode utilisée en microscopie à fluorescence pour mesurer la vitesse de diffusion moléculaire. Elle peut être appliquée pour étudier la mobilité moléculaire dans des cellules vivantes.

Lorsque l'on a une distribution homogène d'une population moléculaire fluorescente, on peut inhiber de manière irréversible sa fluorescence dans une zone restreinte de l'échantillon par photoblanchiment à l'aide d'un flash lumineux obtenu en exposant très brièvement cette zone avec un laser.



On crée ainsi deux populations de molécules (une fluorescente l'autre pas) spatialement distinctes. Si les molécules sont capables de se déplacer dans le milieu, on assiste à une redistribution des deux populations entre la zone blanchie et le milieu adjacent jusqu'à l'homogénéisation des populations : la zone blanchie redevient progressivement fluorescente. L'analyse de la cinétique de récupération de fluorescence permet de déduire la vitesse de déplacement des molécules dans le milieu (plus la vitesse de diffusion est élevée, plus la fluorescence ré-augmente rapidement).

Méthode :

Comme précédemment, les animaux ont d'abord été anesthésiés. 7 jours après l'injection des plasmides, les expériences de FRAP ont été effectuées en appliquant, à l'aide d'un laser à 100% de puissance, 10 itérations à 514 nm sur des régions d'intérêt (ROI pour *Region Of Interest*) de la fibre musculaire. Des images du muscle aux stades « pré-blanchiment », « blanchiment » et « post-blanchiment » ont été enregistrées par le programme du confocal LEICA. De même, l'intensité de la fluorescence dans les ROI a été mesurée au cours du temps afin de pouvoir calculer ensuite la vitesse de récupération de la fluorescence dans ces ROI. Pour les analyses quantitatives, 12 fibres musculaires, au minimum (de 3 animaux différents), ont été analysées de cette façon. Des régions non-photo-blanchies ont été analysées pour chaque fibre musculaire et ont été utilisées comme référence pour normaliser les résultats. Les résultats présentés correspondent à des moyennes (+/- SEM). Leur significativité a été évaluée à l'aide du test *Welch*.

Fiche technique n°6 :

EXPERIMENTATION ANIMALE**Modèles animaux**

Tous les animaux utilisés ont été élevés dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (ou EOPS pour Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) à l'animalerie de GENETHON. Les animaux ont été manipulés après anesthésie en intrapéritonéal (Kétamine 100mg/kg et Xylazine 1 mg/kg) ou après anesthésie gazeuse (isoflurane 2,5 %). Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec les règles européennes d'éthique concernant l'utilisation des animaux pour la recherche expérimentale.

Les souris C57Bl/6, 129SvPaslco, A/J, mdx^{4Cv} et C3-*null* ont été obtenues auprès des laboratoires Charles River (France). La souris B6.A/J.dysf^{prmd}, modèle de LGMD2B, a été obtenue par croisement de souris A/J sur un fond génétique de C57Bl/6. Les souris A/J sont caractérisées par l'insertion d'un rétrotransposon dans l'intron 4 du gène de la dysferline (Ho et al., 2004). La souris mdx^{4Cv} représente un modèle de dystrophie musculaire de Duchenne réalisé par l'insertion d'une mutation dans l'exon 53 du gène de la dystrophine (Im et al., 1996; Judge et al., 2006). La souris C3-*null* est une souris déficiente en calpaïne 3 et correspond au modèle murin de la LGMD2A (réalisé sur un fond génétique de 129SvPaslco). L'exon 1 du gène de la calpaïne 3 a été ciblé par une cassette IRES-LacZ-Lox-PGK-hygro-lox afin de permettre l'expression du gène LacZ et d'empêcher l'expression du gène de la calpaïne 3 à partir du promoteur muscle-spécifique présent en amont de l'exon 1. Le modèle murin *Sgca-null* déficient pour l' α -sarcoglycane (modèle murin de LGMD2D) a été obtenu auprès de Kevin Campbell (Howard Hughes Medical Institute, Iowa City, USA). La construction et la caractérisation de ce modèle ont été décrites précédemment (Duclos et al., 1998).

**Modèles atrophiques obtenus par dénervation**

Des souris âgées de souche 129SvPaslco âgées de 18 à 20 semaines ont subi, sous anesthésie, une dénervation définitive ou transitoire du membre postérieur gauche. Dans le cas de la dénervation définitive, le nerf sciatique a été sectionné de manière à en éliminer 1 cm. Les 2 extrémités ont été ligaturées afin d'empêcher la régénération du nerf et protégées par une poudre antibiotique. Pour les autres souris, le nerf sciatique a été uniquement écrasé pour permettre une dénervation transitoire. 1, 3, 7, 9, 11, 14 ou 21 jours après l'intervention, les muscles des membres postérieurs ont été prélevés et congelés directement en azote liquide.

Modèles atrophiques obtenus après une diète

Des souris de souche 129SvPaslco âgées de 18 à 20 semaines ont été privées de nourriture pendant 48 heures (eau maintenue) ou ont été soumises à une période de diète de 48 heures suivie d'une période de réalimentation de 72 heures.

Injections de vecteurs *in vivo*

Les plasmides apyrogènes ont été préparés à l'aide du kit « Endofree Megaprep » (QIAGEN). 50 µg de plasmides ont été injectés, par voie intramusculaire, dans le TA de souris 129SvPaslco anesthésiées âgées de 8 à 10 semaines. Immédiatement après l'injection, des pulsations électriques ont été appliquées sur le muscle grâce à deux électrodes plates placées de part et d'autre du muscle injecté. L'électrotransfert a été généré par un *électropulsateur ECM-830* (BTX) libérant des pulsations de 20ms à une fréquence de 2Hz. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un voltage de 200V/cm.

Les vecteurs AAVr ont été injectés par voie intramusculaire à raison de $2 \cdot 10^{11}$ génomes viraux en solution dans 25 µL de sérum physiologique (soit environ $8 \cdot 10^{12}$ particules physiques par mL de préparation virale).

Fiche technique n° 7 :

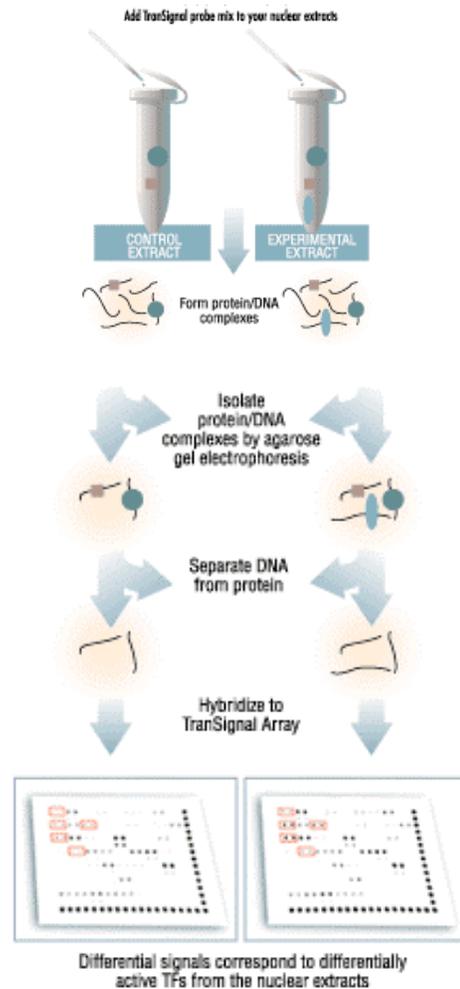
DOSAGE DE L'ACTIVITE DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION

L'expression des gènes est contrôlée par un groupe de protéines appelées facteurs de transcription. En interagissant avec des séquences spécifiques de liaison présentes au niveau des promoteurs de certains gènes, les facteurs de transcription régulent la fréquence de l'initiation de la transcription. Dans cette étude, nous avons recherché, dans des cellules C2 différenciées, les effets de la surexpression de CARP sur l'activité des facteurs de transcription. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques: la technologie *TranSignal*TM Protein/DNA Arrays (PANOMICS) et la méthode *TransAM*TM (ACTIVE MOTIF).

TranSignal Protein/DNA array**Principe :**

Cette technologie permet de comparer simultanément les activités de multiples facteurs de transcription dans différents extraits. La procédure se déroule en 3 étapes illustrées ci-contre :

1. De nombreux oligonucléotides biotinylés, correspondant aux séquences consensus de liaison à l'ADN reconnues par les facteurs de transcription, sont incubés avec les extraits nucléaires d'intérêt de façon à former des complexes protéines-ADN.
2. Les complexes sont ensuite isolés des sondes libres.
3. Les sondes complexées sont ensuite extraites et hybridées sur les membranes *TranSignal Array* sur lesquelles sont « spottées » leurs séquences complémentaires. Les facteurs activés sont alors détectés par une réaction de chemiluminescence basée sur l'action de la horseradish peroxidase (HRP).

**Méthode :**

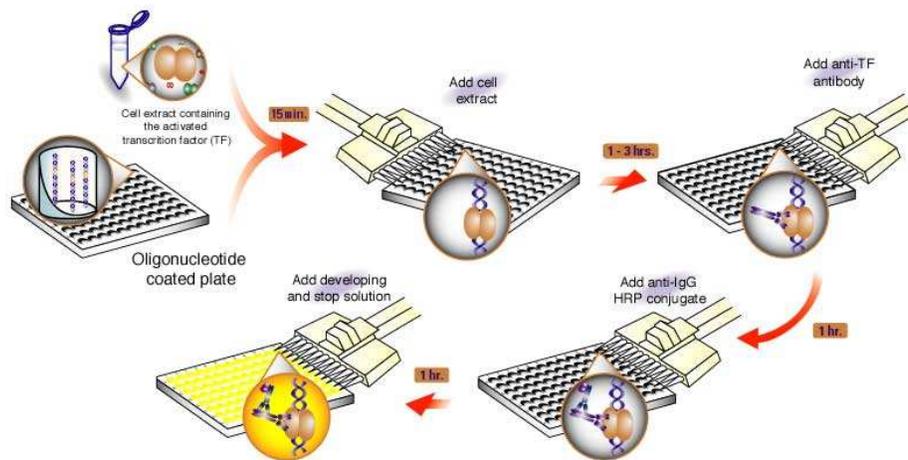
Après 5 jours de différenciation de myotubes C2 surexprimant CARP (ou non pour les extraits témoins), les protéines ont été extraites par fractionnement sub-cellulaire (cf fiches techniques n°4 et 5 pour la transfection et l'extraction protéique). 25 µg d'extraits nucléaires ont été utilisés pour réaliser l'expérience en suivant scrupuleusement le protocole établi par le fournisseur.

Afin de quantifier les résultats, les photographies des membranes ont été capturées numériquement et traitées par le logiciel *Quantity One* (BIORAD).

TransAM

Principe :

Les kits *TransAM* utilisés dans cette étude, permettent, par une méthode basée sur un ELISA, de quantifier l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et FOXO1 dans des extraits nucléaires. Ils contiennent des plaques 96 puits au fond desquels sont disposés les oligonucléotides contenant les sites consensus de fixation de NF- κ B et FoxO (5'GGGACTTCC3' et 5'TTGTTTAC3' respectivement). Les formes actives des facteurs de transcription présentes dans les extraits à tester se lient spécifiquement à ces séquences et les facteurs activés sont ensuite détectés par des anticorps spécifiques. Les anticorps secondaires couplés à l'HRP sont enfin utilisés pour permettre une réaction colorimétrique facilement quantifiable par un spectrophotomètre.



Méthode :

Après 10 jours de différenciation de myotubes C2 surexprimant CARP (ou non pour les extraits témoins), les protéines nucléaires ont été extraites à l'aide du kit « Nuclear Extract » (ACTIVE MOTIF) (cf fiches techniques n°4 et 5 pour la transfection et l'extraction protéique). 1,5 μ g, 40 μ g et 20 μ g d'extraits nucléaires ont été utilisés pour doser l'activation des facteurs NF- κ B p65, NF- κ B RelB et FoxO1 respectivement en suivant consciencieusement le protocole décrit par le fournisseur (n = 3). Les résultats présentés correspondent à des moyennes (+/- SEM). Leur significativité a été évaluée d'après le test *Mann Whitney*.

Fiche technique n°8 :

EXTRACTION D'ARN ET PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

Lors de nos expériences, l'expression de différents gènes a été quantifiée par PCR quantitative *TAQMAN* après extraction des ARN totaux et transcription inverse.

Extraction des ARN

Les ARN ont été extraits à partir de cellules lysées ou de biopsies musculaires homogénéisées dans un tampon contenant 20mM de Tris (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 2 mM d'EGTA, 1 % (v/v) de TRITON X-100, un cocktail d'inhibiteur de protéase (ROCHE) et 2 μ M d'E64.

L'extraction a été réalisée selon le protocole suivant :

- Mettre 200 μ L de lysat cellulaire ou de broyat musculaire dans un tube RNase-free, DNase-free et ajouter 1 μ L de RNAsin (PROMEGA)
- Ajouter 0,8 mL de TRIZOL reagent (INVITROGEN) et mélanger
- Ajouter 0,2 mL de chloroforme (PROLABO), mélanger et laisser reposer 3 min à température ambiante
- Centrifuger à 12000g à 4°C pendant 15 min
- Récupérer la phase supérieure contenant les ARN, ajouter 0,5 mL de Propanol-2 (PROLABO), mélanger et laisser reposer 10 min à température ambiante
- Centrifuger à 12000g à 4°C pendant 15 min
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 0,5 mL d'éthanol 75% froid (PROLABO)
- Centrifuger à 12000g à 4°C pendant 10 min
- Eliminer le surnageant et laisser sécher partiellement le culot à l'air

Afin d'éliminer l'ADN potentiellement contaminant, les échantillons ont ensuite été traités à la DNase à l'aide du kit «DNA-free » (*Dnase treatment and removal reagents*) (AMBION) selon les instructions du fournisseur. Les culots ont été resuspendus dans 30 μ L de mix-DNase et incubés à 37°C pendant 1h avant d'être purifiés en ajoutant 5 μ L de résine (*DNase inactivation reagent*).

A l'issue de l'extraction, la qualité des ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% et leur concentration a été évaluée par mesure de la DO.

Transcription inverse

Principe :

La transcription inverse (ou rétrotranscription) est la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN grâce à une ADN polymérase ARN dépendante ou encore transcriptase inverse.

Méthode :

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN à l'aide du kit « SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR » (INVITROGEN) selon les instructions du fournisseur.

PCR quantitative en temps réel

Principe :

La PCR quantitative en temps réel est basée sur l'activité nucléasique 5'-3' de l'enzyme AmpliTaq Gold qui permet la détection de produit de PCR par libération d'un rapporteur fluorescent durant la PCR. Ce rapporteur est situé en 5' de la sonde nucléotidique qui est également marquée par un quencher en 3'. Le rapporteur fluorescent est FAM. Le quencheur est TAMRA. Quand la sonde est intacte, la proximité du rapporteur et du quencher entraîne un phénomène de FRET (suppression de la fluorescence du reporteur par le quencher). Au cours de la PCR, si le gène d'intérêt est présent, la sonde spécifique se fixe entre les primers. L'activité nucléolytique 5'-3' de 'AmpliTaq Gold coupe la sonde entre le rapporteur et le quencher uniquement si la sonde s'est hybridée au gène d'intérêt (l'AmpliTaq Gold ne digère pas la sonde si elle est libre). La sonde est alors déplacée de la cible et la polymérisation du brin continue. La séparation du rapporteur et du quencher entraîne une augmentation de la fluorescence du rapporteur. Cette augmentation de fluorescence est mesurée par l'appareil et est la conséquence directe de l'amplification du gène ciblé au cours de la PCR.

Méthode :

Le mix de PCR a été préparé de la façon suivante, à partir de l'ADNc dilué 1:8.5, de l'*Absolute QPCR ROX MIX* (ABGENE) et des amorces et sondes *TaqMan* commandées chez PERKIN ELMER.

	[initiale]	vol (µl)	[finale]
Tampon	x2	9	x1
Oligo 1 (F)	20 pmol/µl	0,18	0,2 µM
Oligo 2 (R)	20 pmol/µl	0,18	0,2 µM
Sonde (P)	10 pmol/µl	9,18	0,1 µM
Volume mix		9,54	
Volume mix utilisé		9,5	
Volume ADNc		8,5	
Total		18	

Les conditions de la réaction ont été les suivantes :

		température (°C)	temps (min)
Hold	1	95	10:00
Cycles	40	95	00:15
		60	01:00

L'expression du gène ubiquitaire de la phosphoprotéine (PO) a été utilisée pour normaliser les résultats. Chaque échantillon a été dosé en duplicat et le dosage a été répété au moins 3 fois. Les résultats présentés correspondent à des moyennes (+/- SEM). Leur significativité a été évaluée à l'aide du test *Mann Whitney*.

Les amorces et sondes utilisées sont indiquées dans le tableau suivant :

gène	primers	séquences des primers	sonde	séquence de la sonde
CARP	616mCARP.F	5'CTTGAATCCACAGCCATCCA3'	641mCARP.P	5'CATGTCTGGGAGGAAACGCAGATGTC3'
	706mCARP.R	5'TGGCACTGATTTTGGCTCCT3'		
C3	M811CANP3.F	5'AAACAATCAGCTGGTTTTAC3'	M884CANP3.P	5'TGCCAAGCTCCATGGCT3'
	M954CANP3.R	5'GGAGGGGTGACAGAGTTTTTTG3'		
NF- κ B p65	M1833p65.F	5'GGCGGCACGTTTTACTCTTT3'	M1857 p65.P	5'CGCTTTCGGAGGTGCTTTCCGAC3'
	M1941p65.R	5'TCAGAGTTCCTACCGAAGCAG3'		
FOXO1	1297mFOXO1.F	5'CTAAGTGGCCTGCGAGTCT3'	1369mFOXO1.P	5'CCAGCTCAAATGCTAGTACCATCAGTGGGAG3'
	1445mFOXO1.R	5'GTCCCATCTCCAGGTCAT3'		
MURF1	958mMuRF1.F	5'AGGGCCATTGACTTTGGGAC3'	995mMuRF1.P	5'AGGAGG AGTTTACAGAAGAGGAGGCTGATGAG3'
	1047mMuRF1.R	5'CTCTGTGGTCACGCCCTCT3'		
MAFbx	1235mMAFbx.F	5'CTGGAAGGGCACTGACCATC3'	1265mMAFbx.P	5'CAACAACCCAGAGAGCTGCTCCGTCTC3'
	1353mMAFbx.R	5'TGTTGCTGTGTGCTGGGATT3'		
Cul3	103mCul3.F	5'GACCTTGCTTGCATGTACAAATTATT3'	130mCul3.P	5'AGTCGTGTGCCAAATG3'
	173mCul3.R	5'CTCATAATTACACATGGTCTTCAA3'		
p21	1584p21.F	5'GTACAAGGAGCCAGGCCAAG3'	1629p21.P	5'TCACAGGACACTGAGCAATGGCTGATC3'
	1691p21.R	5'GTGCTTTGACACCCACGGTA3'		
PO	MH181PO.F	5'CTCCAAGCAGATGCAGCAGA3'	M225PO.P	5'CCGTGGTCTGATGGGCAAGAA3'
	M267PO.R	5'ACCATGATGCGCAAGGCCAT3'		
Vcam1	61mVcam1.F	5'TCTGGGAAGCTGGAACGAAGT3'	85mVcam1.P	5'CACGTGGACATCTACT3'
	133mVcam1.R	5'CACTGAATTGAATCTCTGGATCCTT3'		
DII1	65mDII1.F	5'CCGGCGTATTTGAGCTGAA3'	85mDII1.P	5'CTGCAGGAGTTCGTCA3'
	120mDII1.R	5'CCCCAGCAGCCCCCTTCT3'		
Neurl	65mNeurl.F	5'GCCACAAGCGCTCAAGA3'	85mNeurl.P	5'CAGGCCAGCTTCT3'
	121mNeurl.R	5'GGTACTGAAGGTGATGGCATTG3'		
Gsta2	99mGsta2.F	5'GTTTATACAGATCCGGAAGATTTGG3'	138mGsta2.P	5'AGATGGGAATTTGATGTTTGA3'
	179mGsta2.R	5'ATCTCCACCATGGGCACTTG3'		
Kctd7	75mKctd7.F	5'GCACAAGGAGGCCAGTACTAT3'	98mKctd7.P	5'CCATCGGACCCCTC3'
	146mKctd7.R	5'CCCTTCAGTGGCTGCATGTT3'		
Nr2f2	56mNr2f2.F	5'AGTGCATGCAGCCTAACAACA3'	78mNr2f2.P	5'CATGGGCATCGAGAAC3'
	110mNr2f2.R	5'GCGGCCAGTTCGCAA3'		

Fiche technique n°9 :

ETUDE DU TRANSCRIPTOME

Principe :

Une puce à ADN est un ensemble de molécules d'ADN fixées sur une surface qui peut être du verre, du silicium ou bien encore du plastique. Cette biotechnologie récente permet de visualiser les gènes exprimés (transcrits) dans une cellule d'un tissu donné, à un moment donné (embryon, adulte...) et dans un état donné (malade, saine...).

Le principe de la puce à ADN repose sur la particularité de reformer spontanément la double hélice de l'acide désoxyribonucléique face au brin complémentaire. Les quatre molécules de base de l'ADN ont en effet la particularité de s'unir deux à deux.

Concrètement, les ARN totaux sont extraits des cellules et subissent une amplification qui va permettre d'obtenir une quantité de matériel génétique suffisante pour l'expérience. Ensuite ces ARN sont transformés en cDNA (ADN complémentaires) par la technique de reverse transcription. Enfin ils sont transformés au cours d'une dernière étape en cRNA (ARN complémentaires) et marqués par la biotine. Une fois marqués ces ARN complémentaires sont déposés sur la lame de verre qui, elle-même, possède, fixés à sa surface, des fragments de génome recouvrant tous les gènes présents dans une cellule. Les molécules d'ADN fixées sur la lame sont appelées des sondes. Des milliers de sondes peuvent être fixés sur une même puce.

Participation de la société *Partnerchip* :

PARTNERCHIP est un essaimage du Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA/DRR/SGF Évry). Spécialisée dans le domaine de la génomique fonctionnelle, la société propose un large panel de services et produits destinés aux industries du domaine de la santé, de l'agroalimentaire ainsi qu'aux sociétés de biotechnologie. Grâce à sa plate-forme GeneChip® et forte des 15 années d'expérience de ses fondateurs dans le domaine de la génomique et des puces à ADN, PARTNERCHIP propose une ligne complète de services comprenant l'aide au design expérimental, le contrôle qualité des échantillons biologiques (ARN ou ADN), l'hybridation des sondes sur les puces, l'acquisition des images résultant de l'hybridation, la production des données brutes et l'analyse informatique et statistique de ces dernières.

Le support utilisé est la puce MOE 430 2.0 (Ref 900495, *Affymetrix*), puce comportant 45 000 sets de sondes oligonucléotidiques (25 mers) correspondant à 34 000 gènes potentiels.

L'expérience a consisté à comparer les mesures des niveaux d'expression moyennées des 2 échantillons « test » considérés comme un duplicat biologique (C2-CARP1 et C2-CARP2) à celles obtenues en moyennant les 2 échantillons « témoin » (C2-LACZ1 et C2-LACZ2), considérés comme autre duplicat biologique.

Nous avons fourni à PartnerChip 4 ARNs :

- ❖ 2 ARNs purifiés témoins provenant de myotubes (C2) transfectés 2 fois consécutivement par le plasmide pcDNA3-LacZ. Ces échantillons seront notés C2-LACZ1 et C2-LACZ2.
- ❖ 2 ARNs purifiés tests provenant de myotubes (C2) transfectés 2 fois consécutivement par le plasmide pcDNA3-CARP. Ces échantillons seront notés C2-CARP1 et C2-CARP2.

Méthode :

Contrôle qualité : Les ARN sont tout d'abord soumis à un contrôle qualité au spectrophotomètre (Nanodrop, ND-1000) permettant d'estimer la teneur en protéine des échantillons (ratio Abs260/Abs280) et de vérifier l'absence de contamination par des solvants ou des sels (ratio Abs260/Abs230). La concentration exacte de chaque échantillon est estimée en considérant l'absorbance à 260nm. Les ARNs sont également passés sur puces Agilent (Bioanalyzer 2100) afin d'analyser la qualité de leurs pics 16S et 18S.

Synthèse des ADNc : La synthèse se fait en deux étapes. La première étape consiste à synthétiser le premier brin en présence de T7 oligodT-primer et de Superscript II (1h à 42°C). Puis le second brin est synthétisé en présence DNA polymérase (2h à 16° C).

Purification des ADNc synthétisés : Les ADNc synthétisés sont purifiés sur colonne (Qiagen) et élués dans le tampon permettant l'étape de marquage.

Marquage à la biotine : Le marquage à la biotine se fait durant la transcription in vitro des ADNc synthétisés purifiés en ARNc (16h à 37° C).

Purification et quantification des ARNc marqués : Les ARNc transcrits marqués sont purifiés sur colonne (IVT cRNA Cleanup Spin Column, Affymetrix). Après purification, ils sont quantifiés au spectrophotomètre (Nanodrop, ND-1000).

Fragmentation des ARNc biotinylés et purifiés : Les transcrits marqués à la biotine et purifiés sont fragmentés chimiquement (35 min à 94° C) afin d'obtenir des fragments dont la taille varie entre 30 et 200 paires de bases, et ce, pour faciliter et optimiser l'étape d'hybridation qui va suivre. L'efficacité de la fragmentation est validée sur puces Agilent (Bioanalyzer 2100).

Hybridation : Les puces sont préalablement préhybridées en présence du tampon d'hybridation seul, à 45° C pendant 15 minutes (four rotatif). Après cette étape, le tampon de préhybridation est remplacé par un cocktail d'hybridation contenant les fragments marqués additionnés d'un contrôle interne nécessaire à la normalisation ultérieure des puces. Les puces sont alors mises à hybrider pour 16 heures à 45° C (four rotatif) ;

Lavages, révélation et acquisition des images : Après 16 heures, le cocktail d'hybridation est tout d'abord remplacé par un tampon stoppant la réaction d'hybridation, les puces sont ensuite placées dans la station fluïdique GeneChip 450 où elles vont subir plusieurs cycles de rinçages de plus en plus stringents suivis de cycles de révélation à l'aide de Streptavidine couplée à la Phyco-érythrine (SAPE). La fluorescence de cette dernière est enfin mesurée en plaçant les puces dans le scanner GeneChip 3000 (étape d'acquisition de l'image).

Analyse : Les images brutes sont normalisées grâce au témoin interne, traitées et analysées à l'aide du logiciel GCOS (GeneChip Operating Software) version 1.4.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdallah, B.M., P. Boissy, Q. Tan, J. Dahlgard, G.A. Traustadottir, K. Kupisiewicz, J. Laborda, J.M. Delaisse, and M. Kassem. 2007. *dlk1/FA1* regulates the function of human bone marrow mesenchymal stem cells by modulating gene expression of pro-inflammatory cytokines and immune response-related factors. *J Biol Chem.* 282:7339-51.
- Abe, T., D.V. DeHoyos, M.L. Pollock, and L. Garzarella. 2000. Time course for strength and muscle thickness changes following upper and lower body resistance training in men and women. *Eur J Appl Physiol.* 81:174-80.
- Ahmed, N.N., H.L. Grimes, A. Bellacosa, T.O. Chan, and P.N. Tsichlis. 1997. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3627-32.
- Aihara, Y., M. Kurabayashi, M. Arai, L. Kedes, and R. Nagai. 1999. Molecular cloning of rabbit CARP cDNA and its regulated expression in adriamycin-cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta.* 1447:318-24.
- Aihara, Y., M. Kurabayashi, Y. Saito, Y. Ohyama, T. Tanaka, S. Takeda, K. Tomaru, K. Sekiguchi, M. Arai, T. Nakamura, and R. Nagai. 2000a. Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension.* 36:48-53.
- Aihara, Y., M. Kurabayashi, T. Tanaka, S.I. Takeda, K. Tomaru, K.I. Sekiguchi, Y. Ohyama, and R. Nagai. 2000b. Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: possible role of serine/threonine kinase-dependent pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1401-14.
- Akimoto, T., S.C. Pohnert, P. Li, M. Zhang, C. Gumbs, P.B. Rosenberg, R.S. Williams, and Z. Yan. 2005. Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 280:19587-93.
- Allamand, V., O. Broux, I. Richard, F. Fougerousse, N. Chiannikulchai, N. Bourg, L. Brenguier, C. Devaud, P. Pasturaud, A. Pereira de Souza, and *et al.* 1995. Preferential localization of the limb-girdle muscular dystrophy type 2A gene in the proximal part of a 1-cM 15q15.1-q15.3 interval. *Am J Hum Genet.* 56:1417-30.
- Allamand, V., K.M. Donahue, V. Straub, R.L. Davison, B.L. Davidson, and K.P. Campbell. 2000. Early adenovirus-mediated gene transfer effectively prevents muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Gene Ther.* 7:1385-91.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-10.
- Amthor, H., R. Macharia, R. Navarrete, M. Schuelke, S.C. Brown, A. Otto, T. Voit, F. Muntoni, G. Vrbova, T. Partridge, P. Zammit, L. Bungler, and K. Patel. 2007. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:1835-40.
- Anderson, J.E. 2006. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *J Exp Biol.* 209:2276-92.
- Anderson, L.V., R.M. Harrison, R. Pogue, E. Vafiadaki, C. Pollitt, K. Davison, J.A. Moss, S. Keers, A. Pyle, P.J. Shaw, I. Mahjneh, Z. Argov, C.R. Greenberg, K. Wrogemann, T. Bertorini, H.H. Goebel, J.S. Beckmann, R. Bashir, and K.M. Bushby. 2000. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord.* 10:553-9.
- Arber, S., J.J. Hunter, J. Ross, Jr., M. Hongo, G. Sansig, J. Borg, J.C. Perriard, K.R. Chien, and P. Caroni. 1997. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell.* 88:393-403.
- Baar, K., G. Nader, and S. Bodine. 2006. Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass. *Essays Biochem.* 42:61-74.
- Babcock, G.G., and V.M. Fowler. 1994. Isoform-specific interaction of tropomodulin with skeletal muscle and erythrocyte tropomyosins. *J Biol Chem.* 269:27510-8.
- Baghdigian, S., M. Martin, I. Richard, F. Pons, C. Astier, N. Bourg, R.T. Hay, R. Chemaly, G. Halaby, J. Loiselet, L.V. Anderson, A. Lopez de Munain, M. Fardeau, P. Mangeat, J.S. Beckmann, and G. Lefranc. 1999. Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med.* 5:503-11.
- Bakay, M., P. Zhao, J. Chen, and E.P. Hoffman. 2002. A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul Disord.* 12 Suppl 1:S125-41.
- Baldin, V., J. Lukas, M.J. Marcote, M. Pagano, and G. Draetta. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 7:812-21.
- Bang, M.L., T. Centner, F. Fornoff, A.J. Geach, M. Gotthardt, M. McNabb, C.C. Witt, D. Labeit, C.C. Gregorio, H. Granzier, and S. Labeit. 2001a. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res.* 89:1065-72.
- Bang, M.L., R.E. Mudry, A.S. McElhinny, K. Trombitas, A.J. Geach, R. Yamasaki, H. Sorimachi, H. Granzier, C.C. Gregorio, and S. Labeit. 2001b. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol.* 153:413-27.
- Bansal, D., K. Miyake, S.S. Vogel, S. Groh, C.C. Chen, R. Williamson, P.L. McNeil, and K.P. Campbell. 2003. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 423:168-72.
- Barash, I., M.L. Bang, L. Mathew, M.L. Greaser, J. Chen, and R.L. Lieber. 2007. Structural and Regulatory Roles of the Muscle Ankyrin Repeat Protein Family in Skeletal Muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.*
- Barash, I.A., L. Mathew, A.F. Ryan, J. Chen, and R.L. Lieber. 2004. Rapid muscle-specific gene expression changes after a single bout of eccentric contractions in the mouse. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C355-64.

- Barnoy, S., T. Glaser, and N.S. Kosower. 1998. The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1402:52-60.
- Bartoli, M., N. Bourg, D. Stockholm, F. Raynaud, A. Delevacque, Y. Han, P. Borel, K. Seddik, N. Armande, and I. Richard. 2006a. A mouse model for monitoring calpain activity under physiological and pathological conditions. *J Biol Chem*. 281:39672-80.
- Bartoli, M., E. Gicquel, L. Barrault, T. Soheili, M. Malissen, B. Malissen, N. Vincent-Lacaze, N. Perez, B. Udd, O. Danos, and I. Richard. 2008. Mannosidase I inhibition rescues the human {alpha}-sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Hum Mol Genet*.
- Bartoli, M., J. Poupiot, A. Goyenvalle, N. Perez, L. Garcia, O. Danos, and I. Richard. 2006b. Noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer in animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther*. 13:20-8.
- Bartoli, M., J. Poupiot, A. Vulin, F. Fougerousse, L. Arandel, N. Danièle, C. Roudaut, F. Noulet, L. Garcia, O. Danos, and I. Richard. 2007. AAV-mediated delivery of a mutated myostatin propeptide ameliorates calpain 3 but not alpha-sarcoglycan deficiency. *Gene Ther*. 14:733-40.
- Bartoli, M., and I. Richard. 2005. Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*. 37:2115-33.
- Bartoli, M., C. Roudaut, S. Martin, F. Fougerousse, L. Suel, J. Poupiot, E. Gicquel, F. Noulet, O. Danos, and I. Richard. 2006c. Safety and efficacy of AAV-mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Mol Ther*. 13:250-9.
- Bashir, R., S. Britton, T. Strachan, S. Keers, E. Vafiadaki, M. Lako, I. Richard, S. Marchand, N. Bourg, Z. Argov, M. Sadeh, I. Mahjneh, G. Marconi, M.R. Passos-Bueno, S. Moreira Ede, M. Zatz, J.S. Beckmann, and K. Bushby. 1998. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet*. 20:37-42.
- Baumann, H., M. Jaggi, F. Soland, H. Howald, and M.C. Schaub. 1987. Exercise training induces transitions of myosin isoform subunits within histochemically typed human muscle fibres. *Pflugers Arch*. 409:349-60.
- Baumeister, A., S. Arber, and P. Caroni. 1997. Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis. *J Cell Biol*. 139:1231-42.
- Bean, C., M. Salamon, A. Raffaello, S. Campanaro, A. Pallavicini, and G. Lanfranchi. 2005. The *Ankr2d*, *Cdkn1c* and *calcyclin* genes are under the control of *MyoD* during myogenic differentiation. *J Mol Biol*. 349:349-66.
- Beatham, J., K. Gehmlich, P.F. van der Ven, J. Sarparanta, D. Williams, P. Underhill, C. Geier, D.O. Furst, B. Udd, and G. Blanco. 2006. Constitutive upregulations of titin-based signalling proteins in KY deficient muscles. *Neuromuscul Disord*. 16:437-45.
- Bechet, D., A. Tassa, D. Taillandier, L. Combaret, and D. Attaix. 2005. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 37:2098-114.
- Beckmann, J.S., I. Richard, D. Hillaire, O. Broux, C. Antignac, E. Bois, H. Cann, R.W. Cottingham, Jr., N. Feingold, J. Feingold, and *et al*. 1991. A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *C R Acad Sci III*. 312:141-8.
- Benayoun, B., S. Baghdiguan, A. Lajmanovich, M. Bartoli, N. Danièle, E. Gicquel, N. Bourg, F. Raynaud, M.A. Pasquier, L. Suel, H. Lochmuller, G. Lefranc, and I. Richard. 2007. NF- κ B-dependent expression of the antiapoptotic factor c-FLIP is regulated by calpain 3, the protein involved in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Faseb J*.
- Bennin, D.A., A.S. Don, T. Brake, J.L. McKenzie, H. Rosenbaum, L. Ortiz, A.A. DePaoli-Roach, and M.C. Horne. 2002. Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J Biol Chem*. 277:27449-67.
- Berchtold, M.W., H. Brinkmeier, and M. Muntener. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev*. 80:1215-65.
- Bergeron, R., J.M. Ren, K.S. Cadman, I.K. Moore, P. Perret, M. Pypaert, L.H. Young, C.F. Semenkovich, and G.I. Shulman. 2001. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281:E1340-6.
- Bi, X., V. Chang, E. Molnar, R.A. McIlhinney, and M. Baudry. 1996. The C-terminal domain of glutamate receptor subunit 1 is a target for calpain-mediated proteolysis. *Neuroscience*. 73:903-6.
- Blanco, G., G.R. Coulton, A. Biggin, C. Grainge, J. Moss, M. Barrett, A. Berquin, G. Marechal, M. Skynner, P. van Mier, A. Nikitopoulou, M. Kraus, C.P. Ponting, R.M. Mason, and S.D. Brown. 2001. The kyphoscoliosis (ky) mouse is deficient in hypertrophic responses and is caused by a mutation in a novel muscle-specific protein. *Hum Mol Genet*. 10:9-16.
- Bodine, S.C., E. Latres, S. Baumhueter, V.K. Lai, L. Nunez, B.A. Clarke, W.T. Poueymirou, F.J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z.Q. Pan, D.M. Valenzuela, T.M. DeChiara, T.N. Stitt, G.D. Yancopoulos, and D.J. Glass. 2001a. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 294:1704-8.
- Bodine, S.C., T.N. Stitt, M. Gonzalez, W.O. Kline, G.L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J.C. Lawrence, D.J. Glass, and G.D. Yancopoulos. 2001b. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol*. 3:1014-9.
- Boengler, K., F. Pipp, B. Fernandez, T. Ziegelhoeffer, W. Schaper, and E. Deindl. 2003. Arteriogenesis is associated with an induction of the cardiac ankyrin repeat protein (carp). *Cardiovasc Res*. 59:573-81.
- Bogdanovich, S., E.M. McNally, and T.S. Khurana. 2007. Myostatin blockade improves function but not histopathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy 2C. *Muscle Nerve*.

- Bonnemann, C.G., R. Modi, S. Noguchi, Y. Mizuno, M. Yoshida, E. Gussoni, E.M. McNally, D.J. Duggan, C. Angelini, and E.P. Hoffman. 1995. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet.* 11:266-73.
- Brockington, M., Y. Yuva, P. Prandini, S.C. Brown, S. Torelli, M.A. Benson, R. Herrmann, L.V. Anderson, R. Bashir, J.M. Burgunder, S. Fallet, N. Romero, M. Fardeau, V. Straub, G. Storey, C. Pollitt, I. Richard, C.A. Sewry, K. Bushby, T. Voit, D.J. Blake, and F. Muntoni. 2001. Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet.* 10:2851-9.
- Brzank, K.D., and K.S. Pieper. 1986. Characteristics of muscle-cellular adaptation to intense physical loads. *Biomed Biochim Acta.* 45:S107-10.
- Burke, R.E., D.N. Levine, P. Tsairis, and F.E. Zajac, 3rd. 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol.* 234:723-48.
- Burke, R.E., D.N. Levine, and F.E. Zajac, 3rd. 1971. Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science.* 174:709-12.
- Bushby, K.M., and J.S. Beckmann. 1995. The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. *Neuromuscul Disord.* 5:337-43.
- Cai, D., J.D. Frantz, N.E. Tawa, Jr., P.A. Melendez, B.C. Oh, H.G. Lidov, P.O. Hasselgren, W.R. Frontera, J. Lee, D.J. Glass, and S.E. Shoelson. 2004. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 119:285-98.
- Campos, G.E., T.J. Luecke, H.K. Wendeln, K. Toma, F.C. Hagerman, T.F. Murray, K.E. Ragg, N.A. Ratamess, W.J. Kraemer, and R.S. Staron. 2002. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol.* 88:50-60.
- Carlsson, L., J.G. Yu, M. Moza, O. Carpen, and L.E. Thornell. 2007. Myotilin: a prominent marker of myofibrillar remodelling. *Neuromuscul Disord.* 17:61-8.
- Carmignac, V., M.A. Salih, S. Quijano-Roy, S. Marchand, M.M. Al Rayess, M.M. Mukhtar, J.A. Urtizberea, S. Labeit, P. Guicheney, F. Leturcq, M. Gautel, M. Fardeau, K.P. Campbell, I. Richard, B. Estournet, and A. Ferreira. 2007. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol.* 61:340-51.
- Carson, J.A., D. Nettleton, and J.M. Reecy. 2002. Differential gene expression in the rat soleus muscle during early work overload-induced hypertrophy. *Faseb J.* 16:207-9.
- Centner, T., J. Yano, E. Kimura, A.S. McElhinny, K. Pelin, C.C. Witt, M.L. Bang, K. Trombitas, H. Granzier, C.C. Gregorio, H. Sorimachi, and S. Labeit. 2001. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol.* 306:717-26.
- Chalk, A.M., C. Wahlestedt, and E.L. Sonhammer. 2004. Improved and automated prediction of effective siRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 319:264-74.
- Chapman, V.M., D.R. Miller, D. Armstrong, and C.T. Caskey. 1989. Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:1292-6.
- Chaussepied, M., and D. Ginsberg. 2005. E2F and signal transduction pathways. *Cell Cycle.* 4:392-6.
- Chen, Y.W., G.A. Nader, K.R. Baar, M.J. Fedele, E.P. Hoffman, and K.A. Esser. 2002. Response of rat muscle to acute resistance exercise defined by transcriptional and translational profiling. *J Physiol.* 545:27-41.
- Chin, E.R., E.N. Olson, J.A. Richardson, Q. Yang, C. Humphries, J.M. Shelton, H. Wu, W. Zhu, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 12:2499-509.
- Chu, W., D.K. Burns, R.A. Swerlick, and D.H. Presky. 1995. Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J Biol Chem.* 270:10236-45.
- 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.* 275:5131-5.
- Clark, K.R., F. Voulgaropoulou, and P.R. Johnson. 1996. A stable cell line carrying adenovirus-inducible rep and cap genes allows for infectivity titration of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* 3:1124-32.
- Clavel, S., A.S. Coldefy, E. Kurkdjian, J. Salles, I. Margaritis, and B. Derijard. 2006. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev.* 127:794-801.
- Cohen-Haguenaer, O., P.J. Barton, V.C. Nguyen, S. Serero, M.S. Gross, C. Jegou-Foubert, M.F. de Tand, B. Robert, M. Buckingham, and J. Frezal. 1988. Assignment of the human fast skeletal muscle myosin alkali light chains gene (MLC1F/MLC3F) to 2q 32.1-2qter. *Hum Genet.* 78:65-70.
- Cohen, N., E. Kudryashova, I. Kramerova, L.V. Anderson, J.S. Beckmann, K. Bushby, and M.J. Spencer. 2006. Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics.* 6:6075-84.
- Cohn, R.D., C. van Erp, J.P. Habashi, A.A. Soleimani, E.C. Klein, M.T. Lisi, M. Gamradt, C.M. ap Rhys, T.M. Holm, B.L. Loeys, F. Ramirez, D.P. Judge, C.W. Ward, and H.C. Dietz. 2007. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med.* 13:204-10.
- Coleman, M.L., C.J. Marshall, and M.F. Olson. 2004. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:355-66.

- Combaret, L., D. Bechet, A. Claustre, D. Taillandier, I. Richard, and D. Attaix. 2003. Down-regulation of genes in the lysosomal and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways in calpain-3-deficient muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:676-84.
- Conboy, I.M., M.J. Conboy, G.M. Smythe, and T.A. Rando. 2003. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science.* 302:1575-7.
- Conboy, I.M., and T.A. Rando. 2005. Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell Cycle.* 4:407-10.
- Condon, K., L. Silberstein, H.M. Blau, and W.J. Thompson. 1990. Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev Biol.* 138:256-74.
- Cordier, L., A.A. Hack, M.O. Scott, E.R. Barton-Davis, G. Gao, J.M. Wilson, E.M. McNally, and H.L. Sweeney. 2000. Rescue of skeletal muscles of gamma-sarcoglycan-deficient mice with adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Mol Ther.* 1:119-29.
- Craig, K.L., and M. Tyers. 1999. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol.* 72:299-328.
- Daitoku, H., M. Hatta, H. Matsuzaki, S. Aratani, T. Ohshima, M. Miyagishi, T. Nakajima, and A. Fukamizu. 2004. Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10042-7.
- Daitoku, H., K. Yamagata, H. Matsuzaki, M. Hatta, and A. Fukamizu. 2003. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes.* 52:642-9.
- Danièle, N., I. Richard, and M. Bartoli. 2007. Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1608-24.
- de Blaauw, I., N.E. Deutz, and M.F. von Meyenfeldt. 1999. [Cachexia in cancer: disturbances in the protein and aminoacid metabolism]. *Ned Tijdschr Geneesk.* 143:1408-13.
- De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saffig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, and R. Kopan. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature.* 398:518-22.
- de Waard, V., T.A. van Achterberg, N.J. Beauchamp, H. Pannekoek, and C.J. de Vries. 2003. Cardiac ankyrin repeat protein (CARP) expression in human and murine atherosclerotic lesions: activin induces CARP in smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:64-8.
- Dear, T.N., A. Moller, and T. Boehm. 1999. CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics.* 59:243-7.
- Dehoux, M., R. Van Beneden, N. Pasko, P. Lause, J. Verniers, L. Underwood, J.M. Ketelslegers, and J.P. Thissen. 2004. Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogen-1/MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology.* 145:4806-12.
- Dehoux, M.J., R.P. van Beneden, L. Fernandez-Celemin, P.L. Lause, and J.P. Thissen. 2003. Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection. *FEBS Lett.* 544:214-7.
- Dhar, V., V. Adler, A. Lehmann, and Z. Ronai. 1996. Impaired jun-NH2-terminal kinase activation by ultraviolet irradiation in fibroblasts of patients with Cockayne syndrome complementation group B. *Cell Growth Differ.* 7:841-6.
- Di Giovanni, S., A. Molon, A. Broccolini, G. Melcon, M. Mirabella, E.P. Hoffman, and S. Servidei. 2004. Constitutive activation of MAPK cascade in acute quadriplegic myopathy. *Ann Neurol.* 55:195-206.
- Diaz, B.G., T. Moldoveanu, M.J. Kuiper, R.L. Campbell, and P.L. Davies. 2004. Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. *J Biol Chem.* 279:27656-66.
- Douen, A.G., T. Ramlal, S. Rastogi, P.J. Bilan, G.D. Cartee, M. Vranic, J.O. Holloszy, and A. Klip. 1990. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 265:13427-30.
- Dressman, D., K. Araishi, M. Imamura, T. Sasaoka, L.A. Liu, E. Engvall, and E.P. Hoffman. 2002. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther.* 13:1631-46.
- Du, J., X. Wang, C. Mierles, J.L. Bailey, R. Debigare, B. Zheng, S.R. Price, and W.E. Mitch. 2004. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest.* 113:115-23.
- Du, M., L. Sansores-Garcia, Z. Zu, and K.K. Wu. 1998. Cloning and expression analysis of a novel salicylate suppressible gene, Hs-CUL-3, a member of cullin/Cdc53 family. *J Biol Chem.* 273:24289-92.
- Duclos, F., V. Straub, S.A. Moore, D.P. Venzke, R.F. Hrstka, R.H. Crosbie, M. Durbeej, C.S. Lebakken, A.J. Ettinger, J. van der Meulen, K.H. Holt, L.E. Lim, J.R. Sanes, B.L. Davidson, J.A. Faulkner, R. Williamson, and K.P. Campbell. 1998. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol.* 142:1461-71.
- Duguez, S., M. Bartoli, and I. Richard. 2006. Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *Febs J.* 273:3427-36.
- Dunn, S.E., J.L. Burns, and R.N. Michel. 1999. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* 274:21908-12.
- Dyson, J.M., C.J. O'Malley, J. Becanovic, A.D. Munday, M.C. Berndt, I.D. Coghill, H.H. Nandurkar, L.M. Ooms, and C.A. Mitchell. 2001. The SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP-2, binds filamin and regulates submembraneous actin. *J Cell Biol.* 155:1065-79.

- Ebashi, S., and A. Kodama. 1966. Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin. *J Biochem.* 59:425-6.
- Ecarnot-Laubriet, A., K. De Luca, D. Vandroux, M. Moisant, C. Bernard, M. Assem, L. Rochette, and J.R. Teyssier. 2000. Downregulation and nuclear relocation of MLP during the progression of right ventricular hypertrophy induced by chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 32:2385-95.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494-8.
- Esapa, C.T., M.A. Benson, J.E. Schroder, E. Martin-Rendon, M. Brockington, S.C. Brown, F. Muntoni, S. Kroger, and D.J. Blake. 2002. Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum Mol Genet.* 11:3319-31.
- Essers, M.A., S. Weijzen, A.M. de Vries-Smits, I. Saarloos, N.D. de Ruiter, J.L. Bos, and B.M. Burgering. 2004. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *Embo J.* 23:4802-12.
- Fardeau, M., D. Hillaire, C. Mignard, N. Feingold, J. Feingold, D. Mignard, B. de Ubeda, H. Collin, F.M. Tome, I. Richard, and J. Beckmann. 1996. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain.* 119 (Pt 1):295-308.
- Faulkner, G., G. Lanfranchi, and G. Valle. 2001. Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life.* 51:275-82.
- Faulkner, G., A. Pallavicini, A. Comelli, M. Salamon, G. Bortoletto, C. Ievolella, S. Trevisan, S. Kojic, F. Dalla Vecchia, P. Laveder, G. Valle, and G. Lanfranchi. 2000. FATZ, a filamin-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle. *J Biol Chem.* 275:41234-42.
- Fischer, D., X. Sun, G. Gang, T. Pritts, and P.O. Hasselgren. 2000. The gene expression of ubiquitin ligase E3alpha is upregulated in skeletal muscle during sepsis in rats-potential role of glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun.* 267:504-8.
- Fischer, S., J. Vandekerckhove, C. Ampe, P. Traub, and K. Weber. 1986. Protein-chemical identification of the major cleavage sites of the Ca²⁺ proteinase on murine vimentin, the mesenchymal intermediate filament protein. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 367:1147-52.
- Fluck, M. 2003. [Molecular mechanisms in muscle adaptation]. *Ther Umsch.* 60:371-81.
- Fluck, M., and H. Hoppeler. 2003. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 146:159-216.
- Fougerousse, F., M. Bartoli, J. Poupiot, L. Arandel, M. Durand, N. Guerchet, E. Gicquel, O. Danos, and I. Richard. 2007. Phenotypic Correction of alpha-Sarcoglycan Deficiency by Intra-arterial Injection of a Muscle-specific Serotype 1 rAAV Vector. *Mol Ther.* 15:53-61.
- Fougerousse, F., M. Durand, L. Suel, O. Pourquie, A.L. Delezoide, N.B. Romero, M. Abitbol, and J.S. Beckmann. 1998. Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics.* 48:145-56.
- Freiburg, A., and M. Gautel. 1996. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C. Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Biochem.* 235:317-23.
- Frey, N., J.A. Richardson, and E.N. Olson. 2000. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:14632-7.
- Freyssenet, D., M.K. Connor, M. Takahashi, and D.A. Hood. 1999a. Cytochrome c transcriptional activation and mRNA stability during contractile activity in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 277:E26-32.
- Freyssenet, D., M. Di Carlo, and D.A. Hood. 1999b. Calcium-dependent regulation of cytochrome c gene expression in skeletal muscle cells. Identification of a protein kinase c-dependent pathway. *J Biol Chem.* 274:9305-11.
- Frosk, P., T. Weiler, E. Nysten, T. Sudha, C.R. Greenberg, K. Morgan, T.M. Fujiwara, and K. Wrogemann. 2002. Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet.* 70:663-72.
- Fujita, J., T. Tsujinaka, M. Yano, C. Ebisui, H. Saito, A. Katsume, K. Akamatsu, Y. Ohsugi, H. Shiozaki, and M. Monden. 1996. Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways. *Int J Cancer.* 68:637-43.
- Galbiati, F., D. Volonte, C. Minetti, D.B. Bregman, and M.P. Lisanti. 2000. Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C) mutants of caveolin-3 undergo ubiquitination and proteasomal degradation. Treatment with proteasomal inhibitors blocks the dominant negative effect of LGMD-1C mutant and rescues wild-type caveolin-3. *J Biol Chem.* 275:37702-11.
- Galvez, B.G., M. Sampaolesi, S. Brunelli, D. Covarello, M. Gavina, B. Rossi, G. Constantin, Y. Torrente, and G. Cossu. 2006. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol.* 174:231-43.
- Gao, N., D.C. Flynn, Z. Zhang, X.S. Zhong, V. Walker, K.J. Liu, X. Shi, and B.H. Jiang. 2004. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C281-91.
- Garcia Diaz, B.E., S. Gauthier, and P.L. Davies. 2006. Ca²⁺ dependency of calpain 3 (p94) activation. *Biochemistry.* 45:3714-22.
- Garvey, S.M., C. Rajan, A.P. Lerner, W.N. Frankel, and G.A. Cox. 2002. The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics.* 79:146-9.

- Gautel, M., D. Goulding, B. Bullard, K. Weber, and D.O. Furst. 1996. The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci.* 109 (Pt 11):2747-54.
- Ghosh, M., S. Shanker, I. Siwanowicz, K. Mann, W. Machleidt, and T.A. Holak. 2005. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by calpain. *Biol Chem.* 386:85-93.
- Glass, D.J. 2003. Molecular mechanisms modulating muscle mass. *Trends Mol Med.* 9:344-50.
- Glass, D.J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:1974-84.
- Godfrey, C., D. Escolar, M. Brockington, E.M. Clement, R. Mein, C. Jimenez-Mallebrera, S. Torelli, L. Feng, S.C. Brown, C.A. Sewry, M. Rutherford, Y. Shapira, S. Abbs, and F. Muntoni. 2006. Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 60:603-10.
- Gollnick, P.D., and H. Matoba. 1984. Role of carbohydrate in exercise. *Clin Sports Med.* 3:583-93.
- Gomes, M.D., S.H. Lecker, R.T. Jagoe, A. Navon, and A.L. Goldberg. 2001. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14440-5.
- 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.
- Granger, B.L., and E. Lazarides. 1979. Desmin and vimentin coexist at the periphery of the myofibril Z disc. *Cell.* 18:1053-63.
- Granzier, H.L., and S. Labeit. 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res.* 94:284-95.
- Granzier, H.L., and S. Labeit. 2005. Titin and its associated proteins: the third myofilament system of the sarcomere. *Adv Protein Chem.* 71:89-119.
- Greelish, J.P., L.T. Su, E.B. Lankford, J.M. Burkman, H. Chen, S.K. Konig, I.M. Mercier, P.R. Desjardins, M.A. Mitchell, X.G. Zheng, J. Leferovich, G.P. Gao, R.J. Balice-Gordon, J.M. Wilson, and H.H. Stedman. 1999. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med.* 5:439-43.
- Gregorio, C.C., K. Trombitas, T. Centner, B. Kolmerer, G. Stier, K. Kunke, K. Suzuki, F. Obermayr, B. Herrmann, H. Granzier, H. Sorimachi, and S. Labeit. 1998. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol.* 143:1013-27.
- Grounds, M.D., M. Davies, J. Torrisi, T. Shavlakadze, J. White, and S. Hodgetts. 2005. Silencing TNFalpha activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. *Cell Tissue Res.* 320:509-15.
- Grounds, M.D., and J. Torrisi. 2004. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *Faseb J.* 18:676-82.
- Guerin, C.W., and P.C. Holland. 1995. Synthesis and secretion of matrix-degrading metalloproteases by human skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn.* 202:91-9.
- Guo, S., G. Rena, S. Cichy, X. He, P. Cohen, and T. Unterman. 1999. Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem.* 274:17184-92.
- Gutierrez-Cruz, G., A.H. Van Heerden, and K. Wang. 2001. Modular motif, structural folds and affinity profiles of the PEVK segment of human fetal skeletal muscle titin. *J Biol Chem.* 276:7442-9.
- Guttinger, M., E. Tafi, M. Battaglia, M. Coletta, and G. Cossu. 2006. Allogeneic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice. *Exp Cell Res.* 312:3872-9.
- Guttridge, D.C., C. Albanese, J.Y. Reuther, R.G. Pestell, and A.S. Baldwin, Jr. 1999. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol.* 19:5785-99.
- Guyon, J.R., E. Kudryashova, A. Potts, I. Dalkilic, M.A. Brosius, T.G. Thompson, J.S. Beckmann, L.M. Kunkel, and M.J. Spencer. 2003. Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans. *Muscle Nerve.* 28:472-83.
- Hacker, H., and M. Karin. 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE.* 2006:re13.
- Hackman, P., A. Vihola, H. Haravuori, S. Marchand, J. Sarparanta, J. De Seze, S. Labeit, C. Witt, L. Peltonen, I. Richard, and B. Udd. 2002. Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet.* 71:492-500.
- Hanft, L.M., I.N. Rybakova, J.R. Patel, J.A. Rafael-Fortney, and J.M. Ervasti. 2006. Cytoplasmic gamma-actin contributes to a compensatory remodeling response in dystrophin-deficient muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:5385-90.
- Hara, K., K. Yonezawa, M.T. Kozlowski, T. Sugimoto, K. Andrabi, Q.P. Weng, M. Kasuga, I. Nishimoto, and J. Avruch. 1997. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem.* 272:26457-63.
- Haravuori, H., A. Vihola, V. Straub, M. Auranen, I. Richard, S. Marchand, T. Voit, S. Labeit, H. Somer, L. Peltonen, J.S. Beckmann, and B. Udd. 2001. Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology.* 56:869-77.
- Hardt, S.E., and J. Sadoshima. 2002. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ Res.* 90:1055-63.

- Hather, B.M., P.A. Tesch, P. Buchanan, and G.A. Dudley. 1991. Influence of eccentric actions on skeletal muscle adaptations to resistance training. *Acta Physiol Scand.* 143:177-85.
- Hauser, M.A., S.K. Horrigan, P. Salmikangas, U.M. Torian, K.D. Viles, R. Dancel, R.W. Tim, A. Taivainen, L. Bartoloni, J.M. Gilchrist, J.M. Stajich, P.C. Gaskell, J.R. Gilbert, J.M. Vance, M.A. Pericak-Vance, O. Carpen, C.A. Westbrook, and M.C. Speer. 2000. Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A. *Hum Mol Genet.* 9:2141-7.
- Hedden, M.P., and M.G. Buse. 1982. Effects of glucose, pyruvate, lactate, and amino acids on muscle protein synthesis. *Am J Physiol.* 242:E184-92.
- Hentzen, E., M. Lahey, D. Peters, L. Mathew, I. Barash, J. Friden, and R. Lieber. 2005. Stress-Dependent And Stress-Independent Expression Of The Myogenic Regulatory Factors And The Marp Genes After Eccentric Contractions. *J Physiol.*
- Hinata, K., A.M. Gervin, Y. Jennifer Zhang, and P.A. Khavari. 2003. Divergent gene regulation and growth effects by NF-kappa B in epithelial and mesenchymal cells of human skin. *Oncogene.* 22:1955-64.
- 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.
- Ho, M., C.M. Post, L.R. Donahue, H.G. Lidov, R.T. Bronson, H. Goolsby, S.C. Watkins, G.A. Cox, and R.H. Brown, Jr. 2004. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet.* 13:1999-2010.
- Hodgetts, S., H. Radley, M. Davies, and M.D. Grounds. 2006. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 16:591-602.
- Holmes, B., and G.L. Dohm. 2004. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 36:1202-6.
- Holt, K.H., L.E. Lim, V. Straub, D.P. Venzke, F. Duclos, R.D. Anderson, B.L. Davidson, and K.P. Campbell. 1998. Functional rescue of the sarcoglycan complex in the BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. *Mol Cell.* 1:841-8.
- Hood, D.A. 2001. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 90:1137-57.
- Hou, S., H. Guan, and R.P. Ricciardi. 2002. In adenovirus type 12 tumorigenic cells, major histocompatibility complex class I transcription shutoff is overcome by induction of NF-kappaB and relief of COUP-TFII repression. *J Virol.* 76:3212-20.
- Houmeida, A., J. Holt, L. Tskhovrebova, and J. Trinick. 1995. Studies of the interaction between titin and myosin. *J Cell Biol.* 131:1471-81.
- Howald, H. 1982. Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med.* 3:1-12.
- Huang, Y., P. Verheesen, A. Roussis, W. Frankhuizen, I. Ginjaar, F. Haldane, S. Laval, L.V. Anderson, T. Verrips, R.R. Frants, H. de Haard, K. Bushby, J. den Dunnen, and S.M. van der Maarel. 2005. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet.* 13:721-30.
- Hunter, R.B., E. Stevenson, A. Koncarevic, H. Mitchell-Felton, D.A. Essig, and S.C. Kandarian. 2002. Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *Faseb J.* 16:529-38.
- Huxley, H.E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science.* 164:1356-65.
- Hwang, J.I., S. Choi, I.D. Fraser, M.S. Chang, and M.I. Simon. 2005. Silencing the expression of multiple Gbeta-subunits eliminates signaling mediated by all four families of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9493-8.
- Ihara, Y., Y.J. Suzuki, K. Kitta, L.R. Jones, and T. Ikeda. 2002. Modulation of gene expression in transgenic mouse hearts overexpressing calsequestrin. *Cell Calcium.* 32:21-9.
- Ikeda, M., O. Ishida, T. Hinoi, S. Kishida, and A. Kikuchi. 1998. Identification and characterization of a novel protein interacting with Ral-binding protein 1, a putative effector protein of Ral. *J Biol Chem.* 273:814-21.
- Im, W.B., S.F. Phelps, E.H. Copen, E.G. Adams, J.L. Slightom, and J.S. Chamberlain. 1996. Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum Mol Genet.* 5:1149-53.
- Inoue, J., L.D. Kerr, D. Rashid, N. Davis, H.R. Bose, Jr., and I.M. Verma. 1992. Direct association of pp40/1 kappa B beta with rel/NF-kappa B transcription factors: role of ankyrin repeats in the inhibition of DNA binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:4333-7.
- Ishiguro, N., T. Baba, T. Ishida, K. Takeuchi, M. Osaki, N. Araki, E. Okada, S. Takahashi, M. Saito, M. Watanabe, C. Nakada, Y. Tsukamoto, K. Sato, K. Ito, M. Fukayama, S. Mori, H. Ito, and M. Moriyama. 2002. Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol.* 160:1767-78.
- Ishihara, A., F. Kawano, T. Okiura, F. Morimatsu, and Y. Ohira. 2005. Hyperbaric exposure with high oxygen concentration enhances oxidative capacity of neuromuscular units. *Neurosci Res.* 52:146-52.
- Iwata, Y., Y. Katanosaka, Z. Shijun, Y. Kobayashi, H. Hanada, M. Shigekawa, and S. Wakabayashi. 2005. Protective effects of Ca²⁺ handling drugs against abnormal Ca²⁺ homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 70:740-51.
- Jacobs, S.C., J.H. Wokke, P.R. Bar, and A.L. Bootsma. 1995. Satellite cell activation after muscle damage in young and adult rats. *Anat Rec.* 242:329-36.
- Jager, S., C. Handschin, J. St-Pierre, and B.M. Spiegelman. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:12017-22.

- Jagoe, R.T., and A.L. Goldberg. 2001. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 4:183-90.
- Jarry, J., M.F. Rioux, V. Bolduc, Y. Robitaille, V. Khoury, I. Thiffault, M. Tetreault, L. Loisel, J.P. Bouchard, and B. Brais. 2007. A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12. *Brain.* 130:368-80.
- Jejurikar, S.S., and W.M. Kuzon, Jr. 2003. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle. *Apoptosis.* 8:573-8.
- Jeyaseelan, R., C. Poizat, R.K. Baker, S. Abdishoo, L.B. Isterabadi, G.E. Lyons, and L. Kedes. 1997. A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 272:22800-8.
- Jones, S.W., R.J. Hill, P.A. Krasney, B. O'Conner, N. Peirce, and P.L. Greenhaff. 2004. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *Faseb J.* 18:1025-7.
- Judge, A.R., A. Koncarevic, R.B. Hunter, H.C. Liou, R.W. Jackman, and S.C. Kandarian. 2007. Role for I κ B α , but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292:C372-82.
- Judge, L.M., M. Haraguchiln, and J.S. Chamberlain. 2006. Dissecting the signaling and mechanical functions of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci.* 119:1537-46.
- Kamei, Y., S. Miura, M. Suzuki, Y. Kai, J. Mizukami, T. Taniguchi, K. Mochida, T. Hata, J. Matsuda, H. Aburatani, I. Nishino, and O. Ezaki. 2004. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem.* 279:41114-23.
- Kanai, H., T. Tanaka, Y. Aihara, S. Takeda, M. Kawabata, K. Miyazono, R. Nagai, and M. Kurabayashi. 2001. Transforming growth factor-beta/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 88:30-6.
- Karanu, F.N., B. Murdoch, T. Miyabayashi, M. Ohno, M. Koremoto, L. Gallacher, D. Wu, A. Itoh, S. Sakano, and M. Bhatia. 2001. Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood.* 97:1960-7.
- Karlsson, J. 1985. Metabolic adaptations to exercise: a review of potential beta-adrenoceptor antagonist effects. *Am J Cardiol.* 55:48D-58D.
- Kedar, V., H. McDonough, R. Arya, H.H. Li, H.A. Rockman, and C. Patterson. 2004. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:18135-40.
- Kemp, T.J., T.J. Sadusky, F. Saltisi, N. Carey, J. Moss, S.Y. Yang, D.A. Sassoon, G. Goldspink, and G.R. Coulton. 2000. Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics.* 66:229-41.
- Kikuchi, H., and S. Imajoh-Ohmi. 1995. Antibodies specific for proteolyzed forms of protein kinase C alpha. *Biochim Biophys Acta.* 1269:253-9.
- Kim, D.S., Y.K. Hayashi, H. Matsumoto, M. Ogawa, S. Noguchi, N. Murakami, R. Sakuta, M. Mochizuki, D.E. Michele, K.P. Campbell, I. Nonaka, and I. Nishino. 2004. POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology.* 62:1009-11.
- Kim, J.H., M.K. Kim, H.E. Lee, S.J. Cho, Y.J. Cho, B.L. Lee, H.S. Lee, S.Y. Nam, J.S. Lee, and W.H. Kim. 2007. Constitutive phosphorylation of the FOXO1A transcription factor as a prognostic variable in gastric cancer. *Mod Pathol.* 20:835-42.
- Kinbara, K., S. Ishiura, S. Tomioka, H. Sorimachi, S.Y. Jeong, S. Amano, H. Kawasaki, B. Kolmerer, S. Kimura, S. Labeit, and K. Suzuki. 1998. Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem J.* 335 (Pt 3):589-96.
- Kinbara, K., H. Sorimachi, S. Ishiura, and K. Suzuki. 1997. Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys.* 342:99-107.
- Kitamura, T., Y.I. Kitamura, Y. Funahashi, C.J. Shawber, D.H. Castrillon, R. Kollipara, R.A. DePinho, J. Kitajewski, and D. Accili. 2007. A Foxo/Notch pathway controls myogenic differentiation and fiber type specification. *J Clin Invest.* 117:2477-85.
- Knoblich, J.A., K. Sauer, L. Jones, H. Richardson, R. Saint, and C.F. Lehner. 1994. Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during Drosophila embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell.* 77:107-20.
- Kobayashi, T., T. Matsumoto, and K. Kamata. 2005. The PI3-K/Akt pathway: roles related to alterations in vasomotor responses in diabetic models. *J Smooth Muscle Res.* 41:283-302.
- Kojic, S., E. Medeot, E. Guccione, H. Krmac, I. Zara, V. Martinelli, G. Valle, and G. Faulkner. 2004. The Ankrd2 protein, a link between the sarcomere and the nucleus in skeletal muscle. *J Mol Biol.* 339:313-25.
- Kolmerer, B., N. Olivieri, C.C. Witt, B.G. Herrmann, and S. Labeit. 1996. Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol.* 256:556-63.
- Kong, K.Y., J. Ren, M. Kraus, S.P. Finklestein, and R.H. Brown, Jr. 2004. Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells.* 22:981-93.
- Konig, N., F. Raynaud, H. Feane, M. Durand, N. Mestre-Frances, M. Rossel, A. Ouali, and Y. Benyamin. 2003. Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and Microcebus brain. *J Chem Neuroanat.* 25:129-36.

- Krahn, M., A. Lopez de Munain, N. Streichenberger, R. Bernard, C. Pecheux, H. Testard, J.L. Pena-Segura, E. Yoldi, A. Cabello, N.B. Romero, J.J. Poza, S. Bouillot-Eimer, X. Ferrer, M. Goicoechea, F. Garcia-Bragado, F. Leturcq, J.A. Urtizberea, and N. Levy. 2006. CAPN3 mutations in patients with idiopathic eosinophilic myositis. *Ann Neurol.* 59:905-11.
- Kramerova, I., E. Kudryashova, J.G. Tidball, and M.J. Spencer. 2004. Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet.* 13:1373-88.
- Kramerova, I., E. Kudryashova, G. Venkatraman, and M.J. Spencer. 2005. Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet.* 14:2125-34.
- Kramerova, I., E. Kudryashova, B. Wu, and M.J. Spencer. 2006. Regulation of the M-cadherin-beta-catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation. *Mol Cell Biol.* 26:8437-47.
- Krawiec, B.J., R.A. Frost, T.C. Vary, L.S. Jefferson, and C.H. Lang. 2005. Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289:E969-80.
- Kubbutat, M.H., and K.H. Vonsden. 1997. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol.* 17:460-8.
- Kulke, M., S. Fujita-Becker, E. Rostkova, C. Neagoe, D. Labeit, D.J. Manstein, M. Gautel, and W.A. Linke. 2001. Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils. *Circ Res.* 89:874-81.
- Kumar, A., and A.M. Boriek. 2003. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *Faseb J.* 17:386-96.
- Kurek, J.B., L. Austin, S.S. Cheema, P.F. Bartlett, and M. Murphy. 1996. Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. *Neuromuscul Disord.* 6:105-14.
- Kwak, K.B., S.S. Chung, O.M. Kim, M.S. Kang, D.B. Ha, and C.H. Chung. 1993. Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 1175:243-9.
- Kwon, Y.T., Z. Xia, I.V. Davydov, S.H. Lecker, and A. Varshavsky. 2001. Construction and analysis of mouse strains lacking the ubiquitin ligase UBR1 (E3alpha) of the N-end rule pathway. *Mol Cell Biol.* 21:8007-21.
- Labbe, E., L. Lock, A. Letamendia, A.E. Gorska, R. Gryfe, S. Gallinger, H.L. Moses, and L. Attisano. 2007. Transcriptional cooperation between the transforming growth factor-beta and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 67:75-84.
- Labeit, S., and B. Kolmerer. 1995. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* 270:293-6.
- Labeit, S., S. Lahmers, C. Burkart, C. Fong, M. McNabb, S. Witt, C. Witt, D. Labeit, and H. Granzier. 2006. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol.* 362:664-81.
- Lange, A., R.E. Mills, C.J. Lange, M. Stewart, S.E. Devine, and A.H. Corbett. 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem.* 282:5101-5.
- Lange, S., D. Auerbach, P. McLoughlin, E. Perriard, B.W. Schafer, J.C. Perriard, and E. Ehler. 2002. Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci.* 115:4925-36.
- Lange, S., M. Himmel, D. Auerbach, I. Agarkova, K. Hayess, D.O. Furst, J.C. Perriard, and E. Ehler. 2005a. Dimerisation of myomesin: implications for the structure of the sarcomeric M-band. *J Mol Biol.* 345:289-98.
- Lange, S., F. Xiang, A. Yakovenko, A. Vihola, P. Hackman, E. Rostkova, J. Kristensen, B. Brandmeier, G. Franzen, B. Hedberg, L.G. Gunnarsson, S.M. Hughes, S. Marchand, T. Sejersen, I. Richard, L. Edstrom, E. Ehler, B. Udd, and M. Gautel. 2005b. The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science.* 308:1599-603.
- Latres, E., A.R. Amini, A.A. Amini, J. Griffiths, F.J. Martin, Y. Wei, H.C. Lin, G.D. Yancopoulos, and D.J. Glass. 2005. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem.* 280:2737-44.
- Laviola, L., G. Belsanti, A.M. Davalli, R. Napoli, S. Perrini, G.C. Weir, R. Giorgino, and F. Giorgino. 2001. Effects of streptozocin diabetes and diabetes treatment by islet transplantation on in vivo insulin signaling in rat heart. *Diabetes.* 50:2709-20.
- Lecker, S.H. 2003. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 6:271-5.
- Lecker, S.H., R.T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S.R. Price, W.E. Mitch, and A.L. Goldberg. 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J.* 18:39-51.
- Lecker, S.H., V. Solomon, S.R. Price, Y.T. Kwon, W.E. Mitch, and A.L. Goldberg. 1999. Ubiquitin conjugation by the N-end rule pathway and mRNAs for its components increase in muscles of diabetic rats. *J Clin Invest.* 104:1411-20.
- Lee, S.W., G. Dai, Z. Hu, X. Wang, J. Du, and W.E. Mitch. 2004. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J Am Soc Nephrol.* 15:1537-45.
- Leger, B., L. Vergani, G. Soraru, P. Hespel, W. Derave, C. Gobelet, C. D'Ascenzio, C. Angelini, and A.P. Russell. 2006. Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogen-1. *Faseb J.* 20:583-5.

- Lehar, S.M., J. Dooley, A.G. Farr, and M.J. Bevan. 2005. Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors. *Blood*. 105:1440-7.
- Lehti, T.M., M. Silvennoinen, R. Kivela, H. Kainulainen, and J. Komulainen. 2006. Effects of streptozotocin-induced diabetes and physical training on gene expression of extracellular matrix proteins in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290:E900-7.
- Li, H.H., V. Kedar, C. Zhang, H. McDonough, R. Arya, D.Z. Wang, and C. Patterson. 2004. Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest*. 114:1058-71.
- Li, J., D. Dressman, Y.P. Tsao, A. Sakamoto, E.P. Hoffman, and X. Xiao. 1999. rAAV vector-mediated sarcoglycan gene transfer in a hamster model for limb girdle muscular dystrophy. *Gene Ther*. 6:74-82.
- Li, Y.P., Y. Chen, J. John, J. Moylan, B. Jin, D.L. Mann, and M.B. Reid. 2005. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *Faseb J*. 19:362-70.
- Li, Y.P., Y. Chen, A.S. Li, and M.B. Reid. 2003. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 285:C806-12.
- Light, N., and A.E. Champion. 1984. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J*. 219:1017-26.
- Lim, L.E., F. Duclos, O. Broux, N. Bourg, Y. Sunada, V. Allamand, J. Meyer, I. Richard, C. Moomaw, C. Slaughter, and et al. 1995. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet*. 11:257-65.
- Lindboe, C.F., and C.S. Platou. 1984. Effect of immobilization of short duration on the muscle fibre size. *Clin Physiol*. 4:183-8.
- Linke, W.A., M. Ivemeyer, P. Mundel, M.R. Stockmeier, and B. Kolmerer. 1998. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:8052-7.
- Liu, J., M. Aoki, I. Illa, C. Wu, M. Fardeau, C. Angelini, C. Serrano, J.A. Urtizberea, F. Hentati, M.B. Hamida, S. Bohlega, E.J. Culper, A.A. Amato, K. Bossie, J. Oeltjen, K. Bejaoui, D. McKenna-Yasek, B.A. Hosler, E. Schurr, K. Arahata, P.J. de Jong, and R.H. Brown, Jr. 1998. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*. 20:31-6.
- Lloyd, C.M., M. Berendse, D.G. Lloyd, G. Schevzov, and M.D. Grounds. 2004. A novel role for non-muscle gamma-actin in skeletal muscle sarcomere assembly. *Exp Cell Res*. 297:82-96.
- Lo, Y.Y., J.M. Wong, and T.F. Cruz. 1996. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem*. 271:15703-7.
- Lundberg, I.E., and P. Nyberg. 1998. New developments in the role of cytokines and chemokines in inflammatory myopathies. *Curr Opin Rheumatol*. 10:521-9.
- Luo, G., D.D. Hershko, B.W. Robb, C.J. Wray, and P.O. Hasselgren. 2003. IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284:R1249-54.
- Luthi, J.M., H. Howald, H. Claassen, K. Rosler, P. Vock, and H. Hoppeler. 1986. Structural changes in skeletal muscle tissue with heavy-resistance exercise. *Int J Sports Med*. 7:123-7.
- Ma, H., C. Fukiage, M. Azuma, and T.R. Shearer. 1998. Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 39:454-61.
- Machida, S., E.E. Spangenburg, and F.W. Booth. 2003. Forkhead transcription factor FoxO1 transduces insulin-like growth factor's signal to p27Kip1 in primary skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol*. 196:523-31.
- Mackiewicz, Z., M. Hukkanen, D. Povilenaite, A. Sukura, J.E. Fonseca, I. Virtanen, and Y.T. Kontinen. 2003. Dual effects of caspase-1, interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and nerve growth factor receptor in inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol*. 21:41-8.
- Maeda, I., T. Ohta, H. Koizumi, and M. Fukuda. 2001. In vitro ubiquitination of cyclin D1 by ROC1-CUL1 and ROC1-CUL3. *FEBS Lett*. 494:181-5.
- Mahoney, D.J., A. Safdar, G. Parise, S. Melov, M. Fu, L. Macneil, J.J. Kaczor, E.T. Payne, and M.A. Tarnopolsky. 2008. Gene expression profiling in human skeletal muscle during recovery from eccentric exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.
- Mammucari, C., G. Milan, V. Romanello, E. Masiero, R. Rudolf, P. Del Piccolo, S.J. Burden, R. Di Lisi, C. Sandri, J. Zhao, A.L. Goldberg, S. Schiaffino, and M. Sandri. 2007. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 6:458-71.
- Matsuura, I., N.G. Denissova, G. Wang, D. He, J. Long, and F. Liu. 2004. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature*. 430:226-31.
- Matsuzaki, H., H. Daitoku, M. Hatta, K. Tanaka, and A. Fukamizu. 2003. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:11285-90.
- Mauro, A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*. 9:493-5.
- Mayans, O., P.F. van der Ven, M. Wilm, A. Mues, P. Young, D.O. Furst, M. Wilmanns, and M. Gautel. 1998. Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*. 395:863-9.

- McCall, G.E., W.C. Byrnes, A. Dickinson, P.M. Pattany, and S.J. Fleck. 1996. Muscle fiber hypertrophy, hyperplasia, and capillary density in college men after resistance training. *J Appl Physiol.* 81:2004-12.
- McElhinny, A.S., K. Kakinuma, H. Sorimachi, S. Labeit, and C.C. Gregorio. 2002. Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol.* 157:125-36.
- McElhinny, A.S., S.T. Kazmierski, S. Labeit, and C.C. Gregorio. 2003. Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle. *Trends Cardiovasc Med.* 13:195-201.
- McGeachie, J.K. 1989. Sustained cell proliferation in denervated skeletal muscle of mice. *Cell Tissue Res.* 257:455-7.
- McGivan, J.D., and C.I. Bungard. 2007. The transport of glutamine into mammalian cells. *Front Biosci.* 12:874-82.
- McKoy, G., Y. Hou, S.Y. Yang, D. Vega Avelaira, H. Degens, G. Goldspink, and G.R. Coulton. 2005. Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. *J Appl Physiol.* 98:2337-43; discussion 2320.
- McNally, E.M., E. de Sa Moreira, D.J. Duggan, C.G. Bonnemann, M.P. Lisanti, H.G. Lidov, M. Vainzof, M.R. Passos-Bueno, E.P. Hoffman, M. Zatz, and L.M. Kunkel. 1998. Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 7:871-7.
- McPherron, A.C., A.M. Lawler, and S.J. Lee. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 387:83-90.
- Miaczynska, M., S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler-Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R.G. Parton, and M. Zerial. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell.* 116:445-56.
- Micheau, O., S. Lens, O. Gaide, K. Alevizopoulos, and J. Tschopp. 2001. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol.* 21:5299-305.
- Milic, A., N. Danièle, H. Lochmuller, M. Mora, G.P. Comi, M. Moggio, F. Noulet, M.C. Walter, L. Morandi, J. Poupiot, C. Roudaut, R.E. Bittner, M. Bartoli, and I. Richard. 2007. A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay. *Neuromuscul Disord.* 17:148-56.
- Miller, J.B., and C.P. Emerson, Jr. 2003. Does the road to muscle rejuvenation go through Notch? *Sci Aging Knowledge Environ.* 2003:pe34.
- Miller, M.K., M.L. Bang, C.C. Witt, D. Labeit, C. Trombitas, K. Watanabe, H. Granzier, A.S. McElhinny, C.C. Gregorio, and S. Labeit. 2003. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol.* 333:951-64.
- Minetti, C., F. Sotgia, C. Bruno, P. Scartezzini, P. Broda, M. Bado, E. Masetti, M. Mazzocco, A. Egeo, M.A. Donati, D. Volonte, F. Galbiati, G. Cordone, F.D. Bricarelli, M.P. Lisanti, and F. Zara. 1998. Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet.* 18:365-8.
- Modur, V., R. Nagarajan, B.M. Evers, and J. Milbrandt. 2002. FOXO proteins regulate tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand expression. Implications for PTEN mutation in prostate cancer. *J Biol Chem.* 277:47928-37.
- Moldawer, L.L., and E.M. Copeland, 3rd. 1997. Proinflammatory cytokines, nutritional support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. *Cancer.* 79:1828-39.
- Moraczewski, J., E. Piekarska, S. Bonavaud, K. Wosinska, B. Chazaud, and G. Barlovatz-Meimom. 1996. Differential intracellular distribution and activities of mu- and m-calpains during the differentiation of human myogenic cells in culture. *C R Acad Sci III.* 319:681-6.
- Moreira, E.S., M. Vainzof, S.K. Marie, A.L. Sertie, M. Zatz, and M.R. Passos-Bueno. 1997. The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *Am J Hum Genet.* 61:151-9.
- Moreira, E.S., T.J. Wiltshire, G. Faulkner, A. Nilforoushan, M. Vainzof, O.T. Suzuki, G. Valle, R. Reeves, M. Zatz, M.R. Passos-Bueno, and D.E. Jenne. 2000. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet.* 24:163-6.
- Morgan, J.E., and T.A. Partridge. 2003. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:1151-6.
- Moss, F.P., and C.P. Leblond. 1971. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec.* 170:421-35.
- Moyen, C., S. Goudenege, S. Poussard, A.H. Sassi, J.J. Brustis, and P. Cottin. 2004. Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:728-43.
- Muchir, A., G. Bonne, A.J. van der Kooi, M. van Meegen, F. Baas, P.A. Bolhuis, M. de Visser, and K. Schwartz. 2000. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet.* 9:1453-9.
- Mues, A., P.F. van der Ven, P. Young, D.O. Furst, and M. Gautel. 1998. Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett.* 428:111-4.
- Muhle-Goll, C., M. Habeck, O. Cazorla, M. Nilges, S. Labeit, and H. Granzier. 2001. Structural and functional studies of titin's fn3 modules reveal conserved surface patterns and binding to myosin S1—a possible role in the Frank-Starling mechanism of the heart. *J Mol Biol.* 313:431-47.
- Muise-Helmericks, R.C., H.L. Grimes, A. Bellacosa, S.E. Malstrom, P.N. Tschlis, and N. Rosen. 1998. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* 273:29864-72.

- Murphy, R.M., C.A. Goodman, M.J. McKenna, J. Bennie, M. Leikis, and G.D. Lamb. 2007. Calpain-3 is autolyzed and hence activated in human skeletal muscle 24 h following a single bout of eccentric exercise. *J Appl Physiol.* 103:926-31.
- Murphy, R.M., E. Verburg, and G.D. Lamb. 2006. Ca²⁺ activation of diffusible and bound pools of mu-calpain in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 576:595-612.
- Nagueh, S.F., G. Shah, Y. Wu, G. Torre-Amione, N.M. King, S. Lahmers, C.C. Witt, K. Becker, S. Labeit, and H.L. Granzier. 2004. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 110:155-62.
- Nair, K.S., and W.F. Schwenk. 1994. Factors controlling muscle protein synthesis and degradation. *Curr Opin Neurol.* 7:471-4.
- Nakada, C., A. Oka, I. Nonaka, K. Sato, S. Mori, H. Ito, and M. Moriyama. 2003a. Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathol Int.* 53:653-8.
- Nakada, C., Y. Tsukamoto, A. Oka, I. Nonaka, S. Takeda, K. Sato, S. Mori, H. Ito, and M. Moriyama. 2003b. Cardiac-restricted ankyrin-repeated protein is differentially induced in duchenne and congenital muscular dystrophy. *Lab Invest.* 83:711-9.
- Nakae, J., V. Barr, and D. Accili. 2000. Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR. *Embo J.* 19:989-96.
- Nakamura, K., C. Nakada, K. Takeuchi, M. Osaki, K. Shomori, S. Kato, E. Ohama, K. Sato, M. Fukayama, S. Mori, H. Ito, and M. Moriyama. 2002. Altered expression of cardiac ankyrin repeat protein and its homologue, ankyrin repeat protein with PEST and proline-rich region, in atrophic muscles in amyotrophic lateral sclerosis. *Pathobiology.* 70:197-203.
- Nakamura, N., S. Ramaswamy, F. Vazquez, S. Signoretti, M. Loda, and W.R. Sellers. 2000. Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Mol Cell Biol.* 20:8969-82.
- Naya, F.J., B. Mercer, J. Shelton, J.A. Richardson, R.S. Williams, and E.N. Olson. 2000. Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. *J Biol Chem.* 275:4545-8.
- Nicholas, G., M. Thomas, B. Langley, W. Somers, K. Patel, C.F. Kemp, M. Sharma, and R. Kambadur. 2002. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J Cell Physiol.* 193:120-31.
- Nigro, V., E. de Sa Moreira, G. Piluso, M. Vainzof, A. Belsito, L. Politano, A.A. Puca, M.R. Passos-Bueno, and M. Zatz. 1996. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet.* 14:195-8.
- Noguchi, S., E.M. McNally, K. Ben Othmane, Y. Hagiwara, Y. Mizuno, M. Yoshida, H. Yamamoto, C.G. Bonnemant, E. Gussoni, P.H. Denton, T. Kyriakides, L. Middleton, F. Hentati, M. Ben Hamida, I. Nonaka, J.M. Vance, L.M. Kunkel, and E. Ozawa. 1995. Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science.* 270:819-22.
- Obermann, W.M., M. Gautel, F. Steiner, P.F. van der Ven, K. Weber, and D.O. Furst. 1996. The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol.* 134:1441-53.
- Obermann, W.M., M. Gautel, K. Weber, and D.O. Furst. 1997. Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *Embo J.* 16:211-20.
- Oh, S.W., A. Mukhopadhyay, N. Svrcikapa, F. Jiang, R.J. Davis, and H.A. Tissenbaum. 2005. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:4494-9.
- Ohsawa, Y., H. Hagiwara, M. Nakatani, A. Yasue, K. Moriyama, T. Murakami, K. Tsuchida, S. Noji, and Y. Sunada. 2006. Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *J Clin Invest.* 116:2924-34.
- Ohtsuka, H., H. Yajima, K. Maruyama, and S. Kimura. 1997. Binding of the N-terminal 63 kDa portion of connectin/titin to alpha-actinin as revealed by the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett.* 401:65-7.
- Ojuka, E.O. 2004. Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc Nutr Soc.* 63:275-8.
- Olson, E.N., and R.S. Williams. 2000. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays.* 22:510-9.
- Ono, Y., C. Hayashi, N. Doi, F. Kitamura, M. Shindo, K. Kudo, T. Tsubata, M. Yanagida, and H. Sorimachi. 2007. Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics - Possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotechnol J.*
- Paddison, P.J., A.A. Caudy, E. Bernstein, G.J. Hannon, and D.S. Conklin. 2002. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16:948-58.
- Park, Y., E.T. Maizels, Z.J. Feiger, H. Alam, C.A. Peters, T.K. Woodruff, T.G. Unterman, E.J. Lee, J.L. Jameson, and M. Hunzicker-Dunn. 2005. Induction of cyclin D2 in rat granulosa cells requires FSH-dependent relief from FOXO1 repression coupled with positive signals from Smad. *J Biol Chem.* 280:9135-48.
- Parsons, S.A., D.P. Millay, M.A. Sargent, E.M. McNally, and J.D. Molkentin. 2006. Age-dependent effect of myostatin blockade on disease severity in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 168:1975-85.
- Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, and D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol.* 20:505-8.

- Payne, C.M., L.Z. Stern, R.G. Curlless, and L.K. Hannapel. 1975. Ultrastructural fiber typing in normal and diseased human muscle. *J Neurol Sci.* 25:99-108.
- Penner, C.G., G. Gang, C. Wray, J.E. Fischer, and P.O. Hasselgren. 2001. The transcription factors NF-kappaB and AP-1 are differentially regulated in skeletal muscle during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 281:1331-6.
- Penninkhof, F., J.A. Grootegoed, and L.J. Blok. 2004. Identification of REPS2 as a putative modulator of NF-kappaB activity in prostate cancer cells. *Oncogene.* 23:5607-15.
- Perkins, N.D. 2006. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene.* 25:6717-30.
- Petroski, M.D., and R.J. Deshaies. 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:9-20.
- Pintard, L., A. Willems, and M. Peter. 2004. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *Embo J.* 23:1681-7.
- Porter, J.D., S. Khanna, H.J. Kaminski, J.S. Rao, A.P. Merriam, C.R. Richmonds, P. Leahy, J. Li, W. Guo, and F.H. Andrade. 2002. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 11:263-72.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Lin, Z. Wu, J.C. Yoon, C.Y. Zhang, S. Krauss, V.K. Mootha, B.B. Lowell, and B.M. Spiegelman. 2001. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell.* 8:971-82.
- Puszkin, S., E. Puszkin, J. Maimon, C. Rouault, W. Schook, C. Ores, S. Kochwa, and R. Rosenfield. 1977. alpha-Actinin and tropomyosin interactions with a hybrid complex of erythrocyte-actin and muscle-myosin. *J Biol Chem.* 252:5529-37.
- Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender, and T. Werner. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23:4878-84.
- Rathbone, C.R., F.W. Booth, and S.J. Lees. 2008. FoxO3a preferentially induces p27Kip1 expression while impairing muscle precursor cell-cycle progression. *Muscle Nerve.* 37:84-9.
- Raynaud, F., G. Camac, A. Marcilhac, and Y. Benyamin. 2004. m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp Cell Res.* 298:48-57.
- Rena, G., A.R. Prescott, S. Guo, P. Cohen, and T.G. Unterman. 2001. Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J.* 354:605-12.
- Rena, G., Y.L. Woods, A.R. Prescott, M. Pegg, T.G. Unterman, M.R. Williams, and P. Cohen. 2002. Two novel phosphorylation sites on FKHR that are critical for its nuclear exclusion. *Embo J.* 21:2263-71.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall, and A. Khvorova. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.* 22:326-30.
- Richard, I., O. Broux, V. Allamand, F. Fougerousse, N. Chiannikulchai, N. Bourg, L. Brenguier, C. Devaud, P. Pasturaud, C. Roudaut, and *et al.* 1995. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell.* 81:27-40.
- Richard, I., C. Roudaut, S. Marchand, S. Baghdigui, M. Herasse, D. Stockholm, Y. Ono, L. Suel, N. Bourg, H. Sorimachi, G. Lefranc, M. Fardeau, A. Sebille, and J.S. Beckmann. 2000. Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I-kappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J Cell Biol.* 151:1583-90.
- Richard, I., C. Roudaut, A. Saenz, R. Pogue, J.E. Grimbergen, L.V. Anderson, C. Beley, A.M. Cobo, C. de Diego, B. Eymard, P. Gallano, H.B. Ginjaar, A. Lasa, C. Pollitt, H. Topaloglu, J.A. Urtizbere, M. de Visser, A. van der Kooij, K. Bushby, E. Bakker, A. Lopez de Munain, M. Fardeau, and J.S. Beckmann. 1999. Calpainopathy-a survey of mutations and polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 64:1524-40.
- Richter, E.A., W. Derave, and J.F. Wojtaszewski. 2001. Glucose, exercise and insulin: emerging concepts. *J Physiol.* 535:313-22.
- Roberds, S.L., F. Leturcq, V. Allamand, F. Piccolo, M. Jeanpierre, R.D. Anderson, L.E. Lim, J.C. Lee, F.M. Tome, N.B. Romero, and *et al.* 1994. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell.* 78:625-33.
- Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 234:364-8.
- Ronty, M.J., S.K. Leivonen, B. Hinz, A. Rachlin, C.A. Otey, V.M. Kahari, and O.M. Carpen. 2006. Isoform-specific regulation of the actin-organizing protein palladin during TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation. *J Invest Dermatol.* 126:2387-96.
- Rose, A.J., B. Kiens, and E.A. Richter. 2006. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol.* 574:889-903.
- Rose, A.J., B.J. Michell, B.E. Kemp, and M. Hargreaves. 2004. Effect of exercise on protein kinase C activity and localization in human skeletal muscle. *J Physiol.* 561:861-70.
- Rossig, L., A.S. Jadidi, C. Urbich, C. Badorff, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2001. Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 21:5644-57.

- Ruohonen, S., M. Khademi, M. Jagodic, H.S. Taskinen, T. Olsson, and M. Roytta. 2005. Cytokine responses during chronic denervation. *J Neuroinflammation*. 2:26.
- Sacheck, J.M., J.P. Hyatt, A. Raffaello, R.T. Jagoe, R.R. Roy, V.R. Edgerton, S.H. Lecker, and A.L. Goldberg. 2007. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *Faseb J*. 21:140-55.
- Saito, T., C.C. Jones, S. Huang, M.P. Czech, and P.F. Pilch. 2007. The interaction of Akt with APPL1 is required for insulin-stimulated Glut4 translocation. *J Biol Chem*. 282:32280-7.
- Sampaolesi, M., Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D'Antona, M.A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M.G. De Angelis, K.P. Campbell, R. Bottinelli, and G. Cossu. 2003. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*. 301:487-92.
- Sandow, A. 1970. Skeletal muscle. *Annu Rev Physiol*. 32:87-138.
- Sandri, M. 2002. Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 5:249-53.
- Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S.H. Lecker, and A.L. Goldberg. 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 117:399-412.
- Santella, L., K. Kyozuka, L. De Riso, and E. Carafoli. 1998. Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium*. 23:123-30.
- Schlegel, A., and M.P. Lisanti. 2001. The caveolin triad: caveolae biogenesis, cholesterol trafficking, and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev*. 12:41-51.
- Schmid, H., A. Boucherot, Y. Yasuda, A. Henger, B. Brunner, F. Eichinger, A. Nitsche, E. Kiss, M. Bleich, H.J. Grone, P.J. Nelson, D. Schlondorff, C.D. Cohen, and M. Kretzler. 2006. Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes*. 55:2993-3003.
- Schneider, M.R., E. Wolf, A. Hoeflich, and H. Lahm. 2002. IGF-binding protein-5: flexible player in the IGF system and effector on its own. *J Endocrinol*. 172:423-40.
- Schollmeyer, J.E. 1988. Calpain II involvement in mitosis. *Science*. 240:911-3.
- Schutze, N. 2004. siRNA technology. *Mol Cell Endocrinol*. 213:115-9.
- Schweisguth, F. 2004. Regulation of notch signaling activity. *Curr Biol*. 14:R129-38.
- Seoane, J., H.V. Le, L. Shen, S.A. Anderson, and J. Massague. 2004. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*. 117:211-23.
- Shisheva, A., T.C. Sudhof, and M.P. Czech. 1994. Cloning, characterization, and expression of a novel GDP dissociation inhibitor isoform from skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 14:3459-68.
- Singer, J.D., M. Gurian-West, B. Clurman, and J.M. Roberts. 1999. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev*. 13:2375-87.
- Sorimachi, H., A. Freiburg, B. Kolmerer, S. Ishiura, G. Stier, C.C. Gregorio, D. Labeit, W.A. Linke, K. Suzuki, and S. Labeit. 1997a. Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol*. 270:688-95.
- Sorimachi, H., S. Imajoh-Ohmi, Y. Emori, H. Kawasaki, S. Ohno, Y. Minami, and K. Suzuki. 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*. 264:20106-11.
- Sorimachi, H., S. Ishiura, and K. Suzuki. 1997b. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*. 328 (Pt 3):721-32.
- Sorimachi, H., K. Kinbara, S. Kimura, M. Takahashi, S. Ishiura, N. Sasagawa, N. Sorimachi, H. Shimada, K. Tagawa, K. Maruyama, and *et al*. 1995. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem*. 270:31158-62.
- Sorimachi, H., S. Ohmi, Y. Emori, H. Kawasaki, T.C. Saido, S. Ohno, Y. Minami, and K. Suzuki. 1990. A novel member of the calcium-dependent cysteine protease family. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 371 Suppl:171-6.
- Sorimachi, H., N. Toyama-Sorimachi, T.C. Saido, H. Kawasaki, H. Sugita, M. Miyasaka, K. Arahata, S. Ishiura, and K. Suzuki. 1993. Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem*. 268:10593-605.
- Soteriou, A., M. Gamage, and J. Trinick. 1993. A survey of interactions made by the giant protein titin. *J Cell Sci*. 104 (Pt 1):119-23.
- Southgate, R.J., B. Neill, O. Prelovsek, A. El-Osta, Y. Kamei, S. Miura, O. Ezaki, T.J. McLoughlin, W. Zhang, T.G. Unterman, and M.A. Febbraio. 2007. FOXO1 regulates the expression of 4E-BP1 and inhibits mTOR signaling in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem*. 282:21176-86.
- Spate, U., and P.C. Schulze. 2004. Proinflammatory cytokines and skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 7:265-9.
- Squire, J.M., P.K. Luther, and C. Knupp. 2003. Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. *J Mol Biol*. 331:713-24.
- Stabile, E., Y.F. Zhou, M. Saji, M. Castagna, M. Shou, T.D. Kinnaird, R. Baffour, M.D. Ringel, S.E. Epstein, and S. Fuchs. 2003. Akt controls vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by delaying G1/S exit. *Circ Res*. 93:1059-65.

- Stevenson, E.J., P.G. Giresi, A. Koncarevic, and S.C. Kandarian. 2003. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 551:33-48.
- Stitt, T.N., D. Drujan, B.A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyeva, W.O. Kline, M. Gonzalez, G.D. Yancopoulos, and D.J. Glass. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* 14:395-403.
- Stockholm, D., C. Barbaud, S. Marchand, F. Ammarguella, D. Barritault, I. Richard, J. Beckmann, and I. Martelly. 1999. Studies on calpain expression during differentiation of rat satellite cells in primary cultures in the presence of heparin or a mimic compound. *Exp Cell Res.* 252:392-400.
- Strack, P., M. Caligiuri, M. Pelletier, M. Boisclair, A. Theodoras, P. Beer-Romero, S. Glass, T. Parsons, R.A. Copeland, K.R. Auger, P. Benfield, L. Brizuela, and M. Rolfe. 2000. SCF(beta-TRCP) and phosphorylation dependent ubiquitination of I kappa B alpha catalyzed by Ubc3 and Ubc4. *Oncogene.* 19:3529-36.
- Struhl, G., and I. Greenwald. 1999. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in Drosophila. *Nature.* 398:522-5.
- Suzuki, N., M. Aoki, Y. Hinuma, T. Takahashi, Y. Onodera, A. Ishigaki, M. Kato, H. Warita, M. Tateyama, and Y. Itoyama. 2005. Expression profiling with progression of dystrophic change in dysferlin-deficient mice (SJL). *Neurosci Res.* 52:47-60.
- Takano, H., I. Komuro, T. Oka, I. Shiojima, Y. Hiroi, T. Mizuno, and Y. Yazaki. 1998. The Rho family G proteins play a critical role in muscle differentiation. *Mol Cell Biol.* 18:1580-9.
- Takebayashi, T., H. Higashi, H. Sudo, H. Ozawa, E. Suzuki, O. Shirado, H. Katoh, and M. Hatakeyama. 2003. NF-kappa B-dependent induction of cyclin D1 by retinoblastoma protein (pRB) family proteins and tumor-derived pRB mutants. *J Biol Chem.* 278:14897-905.
- Talmadge, R.J., R.R. Roy, and V.R. Edgerton. 1995. Prominence of myosin heavy chain hybrid fibers in soleus muscle of spinal cord-transected rats. *J Appl Physiol.* 78:1256-65.
- Tang, E.D., G. Nunez, F.G. Barr, and K.L. Guan. 1999. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem.* 274:16741-6.
- Taveau, M., N. Bourg, G. Sillon, C. Roudaut, M. Bartoli, and I. Richard. 2003. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lysosomes sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol.* 23:9127-35.
- Tews, D.S., and H.H. Goebel. 1996. Cytokine expression profile in idiopathic inflammatory myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:342-7.
- Thompson, T.G., Y.M. Chan, A.A. Hack, M. Brosius, M. Rajala, H.G. Lidov, E.M. McNally, S. Watkins, and L.M. Kunkel. 2000. Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol.* 148:115-26.
- Tidball, J.G. 1991. Force transmission across muscle cell membranes. *J Biomech.* 24 Suppl 1:43-52.
- Tintignac, L.A., J. Lagirand, S. Batonnet, V. Sirri, M.P. Leibovitch, and S.A. Leibovitch. 2005. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 280:2847-56.
- Tsukamoto, Y., T. Senda, T. Nakano, C. Nakada, T. Hida, N. Ishiguro, G. Kondo, T. Baba, K. Sato, M. Osaki, S. Mori, H. Ito, and M. Moriyama. 2002. Arpp, a new homolog of carp, is preferentially expressed in type 1 skeletal muscle fibers and is markedly induced by denervation. *Lab Invest.* 82:645-55.
- Udd, B., A. Vihola, J. Sarparanta, I. Richard, and P. Hackman. 2005. Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurology.* 64:636-42.
- van der Ven, P.F., S. Wiesner, P. Salmikangas, D. Auerbach, M. Himmel, S. Kempa, K. Hayess, D. Pacholsky, A. Taivainen, R. Schroder, O. Carpen, and D.O. Furst. 2000. Indications for a novel muscular dystrophy pathway. gamma-filamin, the muscle-specific filamin isoform, interacts with myotilin. *J Cell Biol.* 151:235-48.
- van Deursen, J., J. Boer, L. Kasper, and G. Grosveld. 1996. G2 arrest and impaired nucleocytoplasmic transport in mouse embryos lacking the proto-oncogene CAN/Nup214. *Embo J.* 15:5574-83.
- Vary, T.C., and C.J. Lynch. 2007. Nutrient signaling components controlling protein synthesis in striated muscle. *J Nutr.* 137:1835-43.
- Ventadour, S., and D. Attaix. 2006. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Rheumatol.* 18:631-5.
- Vlahovich, N., G. Schevzov, V. Nair-Shaliker, B. Ilkovski, S.T. Artap, J.E. Joya, A.J. Kee, K.N. North, P.W. Gunning, and E.C. Hardeman. 2008. Tropomyosin 4 defines novel filaments in skeletal muscle associated with muscle remodelling/regeneration in normal and diseased muscle. *Cell Motil Cytoskeleton.* 65:73-85.
- Vogt, P.K., H. Jiang, and M. Aoki. 2005. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle.* 4:908-13.
- Voisin, L., D. Breuille, L. Combaret, C. Pouyet, D. Taillandier, E. Aourousseau, C. Obled, and D. Attaix. 1996. Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest.* 97:1610-7.
- von Haehling, S., S. Genth-Zotz, S.D. Anker, and H.D. Volk. 2002. Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism. *Int J Cardiol.* 85:173-83.
- von Manteuffel, S.R., A.C. Gingras, X.F. Ming, N. Sonenberg, and G. Thomas. 1996. 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:4076-80.

- Wakeling, J.M., M. Kaya, G.K. Temple, I.A. Johnston, and W. Herzog. 2002. Determining patterns of motor recruitment during locomotion. *J Exp Biol.* 205:359-69.
- Walowitz, J.L., M.E. Bradley, S. Chen, and T. Lee. 1998. Proteolytic regulation of the zinc finger transcription factor YY1, a repressor of muscle-restricted gene expression. *J Biol Chem.* 273:6656-61.
- Wang, C.Y., J.D. Shi, P. Yang, P.G. Kumar, Q.Z. Li, Q.G. Run, Y.C. Su, H.S. Scott, K.J. Kao, and J.X. She. 2003. Molecular cloning and characterization of a novel gene family of four ancient conserved domain proteins (ACDP). *Gene.* 306:37-44.
- Wang, K., J. McClure, and A. Tu. 1979. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:3698-702.
- Wasserman, W.W., M. Palumbo, W. Thompson, J.W. Fickett, and C.E. Lawrence. 2000. Human-mouse genome comparisons to locate regulatory sites. *Nat Genet.* 26:225-8.
- Wegner, A. 1979. Equilibrium of the actin-tropomyosin interaction. *J Mol Biol.* 131:839-53.
- Weiler, T., R. Bashir, L.V. Anderson, K. Davison, J.A. Moss, S. Britton, E. Nylen, S. Keers, E. Vafiadaki, C.R. Greenberg, C.R. Bushby, and K. Wrogemann. 1999. Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Hum Mol Genet.* 8:871-7.
- Welsh, C.F., K. Roovers, J. Villanueva, Y. Liu, M.A. Schwartz, and R.K. Assoian. 2001. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol.* 3:950-7.
- Wenzel, K., C. Geier, F. Qadri, N. Hubner, H. Schulz, B. Erdmann, V. Gross, D. Bauer, R. Dechend, R. Dietz, K.J. Osterziel, S. Spuler, and C. Ozcelik. 2007. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med.* 85:1203-14.
- Wenzel, K., J. Zabojszcza, M. Carl, S. Taubert, A. Lass, C.L. Harris, M. Ho, H. Schulz, O. Hummel, N. Hubner, K.J. Osterziel, and S. Spuler. 2005. Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *J Immunol.* 175:6219-25.
- Whalen, R.G., J.B. Harris, G.S. Butler-Browne, and S. Sesodia. 1990. Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol.* 141:24-40.
- Wilkins, A., Q. Ping, and C.L. Carpenter. 2004. RhoBTB2 is a substrate of the mammalian Cul3 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev.* 18:856-61.
- Willems, A.R., S. Lanker, E.E. Patton, K.L. Craig, T.F. Nason, N. Mathias, R. Kobayashi, C. Wittenberg, and M. Tyers. 1996. Cdc53 targets phosphorylated G1 cyclins for degradation by the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell.* 86:453-63.
- Wilmore, D.W. 2001. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury. *J Nutr.* 131:2543S-9S; discussion 2550S-1S.
- Wing, S.S. 2005. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:2075-87.
- Witt, C.C., Y. Ono, E. Puschmann, M. McNabb, Y. Wu, M. Gotthardt, S.H. Witt, M. Haak, D. Labeit, C.C. Gregorio, H. Sorimachi, H. Granzier, and S. Labeit. 2004. Induction and myofibrillar targeting of CARP, and suppression of the Nkx2.5 pathway in the MDM mouse with impaired titin-based signaling. *J Mol Biol.* 336:145-54.
- Witt, S.H., H. Granzier, C.C. Witt, and S. Labeit. 2005. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol.* 350:713-22.
- Wolf, R.E., and B.A. Baethge. 1990. Interleukin-1 alpha, interleukin-2, and soluble interleukin-2 receptors in polymyositis. *Arthritis Rheum.* 33:1007-14.
- Woods, Y.L., G. Rena, N. Morrice, A. Barthel, W. Becker, S. Guo, T.G. Unterman, and P. Cohen. 2001. The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem J.* 355:597-607.
- Wray, C.J., J.M. Mammen, D.D. Hershko, and P.O. Hasselgren. 2003. Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:698-705.
- Wright, D.C., D.H. Han, P.M. Garcia-Roves, P.C. Geiger, T.E. Jones, and J.O. Holloszy. 2007. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem.* 282:194-9.
- Wu, H., S.B. Kanatous, F.A. Thurmond, T. Gallardo, E. Isotani, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2002. Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science.* 296:349-52.
- Wu, H., F.J. Naya, T.A. McKinsey, B. Mercer, J.M. Shelton, E.R. Chin, A.R. Simard, R.N. Michel, R. Bassel-Duby, E.N. Olson, and R.S. Williams. 2000. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *Embo J.* 19:1963-73.
- Xiao, X., J. Li, Y.P. Tsao, D. Dressman, E.P. Hoffman, and J.F. Watchko. 2000. Full functional rescue of a complete muscle (TA) in dystrophic hamsters by adeno-associated virus vector-directed gene therapy. *J Virol.* 74:1436-42.
- Xu, J., Z. Zhou, L. Zeng, Y. Huang, W. Zhao, C. Cheng, M. Xu, Y. Xie, and Y. Mao. 2001. Cloning, expression and characterization of a novel human REPS1 gene. *Biochim Biophys Acta.* 1522:118-21.
- Xylourgidis, N., P. Roth, N. Sabri, V. Tsarouhas, and C. Samakovlis. 2006. The nucleoporin Nup214 sequesters CRM1 at the nuclear rim and modulates NFkappaB activation in Drosophila. *J Cell Sci.* 119:4409-19.
- Yaffe, D., and O. Saxel. 1977. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 270:725-7.

- Yang, W., Y. Zhang, G. Ma, X. Zhao, Y. Chen, and D. Zhu. 2005a. Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 326:660-6.
- Yang, Y., H. Hou, E.M. Haller, S.V. Nicosia, and W. Bai. 2005b. Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *Embo J.* 24:1021-32.
- Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, I. Lavon, S. Amit, A.M. Manning, J.S. Andersen, M. Mann, F. Mercurio, and Y. Ben-Neriah. 1998. Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature.* 396:590-4.
- Young, P., E. Ehler, and M. Gautel. 2001. Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J Cell Biol.* 154:123-36.
- Yu, J.Y., S.L. DeRuiter, and D.L. Turner. 2002. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6047-52.
- Zador, E., L. Dux, and F. Wuytack. 1999. Prolonged passive stretch of rat soleus muscle provokes an increase in the mRNA levels of the muscle regulatory factors distributed along the entire length of the fibers. *J Muscle Res Cell Motil.* 20:395-402.
- Zhang, P., X. Chen, and M. Fan. 2007. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses.* 69:310-21.
- Zhang, X., L. Gan, H. Pan, S. Guo, X. He, S.T. Olson, A. Mesecar, S. Adam, and T.G. Unterman. 2002. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem.* 277:45276-84.
- Zhao, B., S. Hou, and R.P. Ricciardi. 2003. Chromatin repression by COUP-TFII and HDAC dominates activation by NF- κ B in regulating major histocompatibility complex class I transcription in adenovirus tumorigenic cells. *Virology.* 306:68-76.
- Zhao, J., J.J. Brault, A. Schild, P. Cao, M. Sandri, S. Schiaffino, S.H. Lecker, and A.L. Goldberg. 2007. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophiying Muscle Cells. *Cell Metab.* 6:472-83.
- Zhu, T., L. Zhou, S. Mori, Z. Wang, C.F. McTiernan, C. Qiao, C. Chen, D.W. Wang, J. Li, and X. Xiao. 2005. Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer. *Circulation.* 112:2650-9.
- Zhu, Y., J.A. Richardson, L.F. Parada, and J.M. Graff. 1998. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell.* 94:703-14.
- Zolk, O., M. Frohme, A. Maurer, F.W. Kluxen, B. Hentsch, D. Zubakov, J.D. Hoheisel, I.H. Zucker, S. Pepe, and T. Eschenhagen. 2002. Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:1377-82.
- Zou, Y., S. Evans, J. Chen, H.C. Kuo, R.P. Harvey, and K.R. Chien. 1997. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development.* 124:793-804.

PUBLICATIONS

|